



**EVALUACIÓN DE INCUBADORAS Y DENSIDADES DE SIEMBRA PARA EL  
LEVANTE DE CRÍAS RECIEN NACIDAS DE CABALLITOS DE MAR**

***Hippocampus reidi* Ginsburg, 1933**

**INVESTIGADORA: HEYDI VIVIANA PÉREZ FEDRICH**

**DIRECTORA: GLORIA HELENA OSPINA SALAZAR**

**CO-DIRECTORA: MARISOL SANTOS ACEVEDO**

**UNIVERSIDAD DEL MAGDALENA  
FACULTAD DE INGENIERÍA  
PROGRAMA DE INGENIERÍA PESQUERA  
SANTA MARTA  
2011**

**Nota de aceptación**

---

---

---

**Presidente del jurado**

---

---

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco al Instituto de Investigaciones Marinas y costeras José Benito Vives De Andrés – INVEMAR.

Al grupo del Laboratorio de Bioprospección Marina del INVEMAR - LABBIP: Miguel Sánchez, Johann López, Andrés Melo y Lina Sánchez, por su compañía ayuda y compañerismo en el desarrollo de este arduo estudio.

A Javier Gómez León, Marisol Santos y Gloria Ospina por la oportunidad brindada, confianza y apoyo.

Al Sr. Molina por su apoyo en los fines de semana

A todos aquellos que dentro del instituto colaboraron de alguna manera en este proceso.

A mis compañeros de Universidad: Rubén Acevedo, Andrés Ramos, Eddy Sanjuanélo, Brian Effer, Marina Villazon y Leda Pabón, por los momentos compartidos gracias.

A Juan Carlos Narváez y felix cuello por sus aportes en este trabajo.

A los directivos del programa de Ing. Pesquera Saeko Gaitán, Juan Carlos de la Rosa y Carlos Gómez por su ayuda y colaboración.

A todos mis profesores por sus enseñanzas paciencia y dedicación: Nicolás Chaparro, Julio Candanoza, Armando Lacera, Harley Zúñiga y alvaro cabrera.

## **DEDICATORIA**

### ***A DIOS***

*Porque siempre ilumina mi camino en momentos de dificultad llenándome de paciencia y perseverancia. Gracias por no desampararme y estar siempre a mi lado.*

### ***A MI FAMILIA***

*A mis padres Esperanza Fedrich y Álvaro Pérez, porque con sus esfuerzos no solo me ayudaron a crecer sino también a valorar cada cosa en la vida, gracias papitos por ser tan especiales y tener tanto amor y comprensión los amo mucho.*

*A mi hermano Álvaro porque es la persona que siempre me ha dado alas para soñar y además cumplir cada uno de mis sueños. Te quiero mucho hermanito.*

*A mi hermana Paola y mis sobrinos por su comprensión ternura y alegría los amo.*

### ***A MIS AMIGOS***

*Mirla Sánchez mi hermana, mi mejor amiga, gracias por soportar mis locuras de las cuales también te he hecho padecer. Te deseo éxitos.*

*Lina Sánchez, Tivisay Mejía, Johana Vega, Angelica Rodríguez, Erika Ortiz, Jair Mendoza, Eugenia Oviedo, Katherine Carreño, Giancarlos, Felipe Gómez, Carlos Puentes y Víctor Santafé. Por brindarme su valiosa amistad, por mostrar siempre su lado humilde y afectuoso.*

*A Lina Sánchez por sus enseñanzas dentro del laboratorio, su amistad y apoyo.*

*A Yucellis Daniels y familia por su gran amistad y valiosa compañía, por gratos momentos y por cada cosa por la que pasamos juntas.*

*A Andersson hoyos, Ricardo Ricardo, David Builes fue un placer para mí conocerlos y crear ese gran lazo de amistad que espero conservar siempre.*

## CONTENIDO

<b>1</b>	<b>RESUMEN</b>	<b>XI</b>
<b>2</b>	<b>ABSTRACT</b>	<b>XIII</b>
<b>3</b>	<b>PRESENTACIÓN</b>	<b>14</b>
<b>4</b>	<b>PLANTEAMIENTO DE LA PREGUNTA Y JUSTIFICACIÓN</b>	<b>16</b>
<b>5</b>	<b>ANTECEDENTES</b>	<b>18</b>
<b>6</b>	<b>MARCO TEÓRICO CONCEPTUAL</b>	<b>23</b>
<b>7</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>26</b>
7.1	OBJETIVO GENERAL:	26
7.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	26
<b>8</b>	<b>DISEÑO METODOLÓGICO</b>	<b>27</b>
8.1	INFRAESTRUCTURA	27
8.2	DISEÑO DE INCUBADORAS PARA LEVANTE DE CRÍAS	28
8.3	MANTENIMIENTO DE REPRODUCTORES Y ENSAYOS PREVIOS PARA LA ALIMENTACIÓN Y MANEJO DE LAS CRÍAS	29
8.3.1	Sistemas y mantenimiento de reproductores	30
8.3.2	Ensayos previos con crías de caballitos de mar	31
8.3.2.1	Alimentación durante la primera semana de vida	31
8.3.2.2	Aplicación de anestesia	31
8.4	BIOENSAYOS DE DENSIDAD	32
8.4.1	Manejo de las crías	33
8.4.1.1	Colecta y siembra	33
8.4.1.2	Reposición de organismos y control de la densidad	34
8.4.2	Alimentación	34
8.4.2.1	Protocolo para el cultivo y cosecha de alimento vivo	35
8.4.2.2	Protocolo de enriquecimiento del alimento vivo	38
8.4.3	Mantenimiento y limpieza de los sistemas	39
8.4.3.1	Monitoreo de la calidad de agua	39
8.4.3.2	Limpieza de los sistemas	40
8.4.4	Muestreos	40

8.4.5	Análisis de los datos .....	41
<b>9</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>43</b>
9.1	ENSAYOS DE OBTENCIÓN, ALIMENTACIÓN Y MANEJO DE LAS CRÍAS	
	43	
9.1.1	Manejo de reproductores .....	43
9.1.2	Ensayo de alimentación durante la primera semana .....	43
9.1.3	Aplicación de anestesia .....	44
9.2	DISEÑO DE INCUBADORAS PARA LEVANTE DE CRÍAS. ....	46
9.2.1	Sistema 1: Acuario de 25 L .....	46
9.2.2	Sistema 2: Baldes de 18 L .....	47
9.2.3	Sistema 3. Recipientes plásticos de 2 y 3,5 L .....	49
9.2.4	Sistema 4: Incubadora de 3,5 L .....	52
9.2.5	Sistema 5: Incubadora de 12 L .....	53
9.2.6	Sistema 6: Incubadora de 16 L con filtro de cascajo.....	54
9.2.7	Sistema 7: Incubadora de 16 L con filtro de desagüe en PVC.....	55
9.2.8	Sistema 8: Incubadora de 16 L con desagüe de botella .....	57
9.2.9	Sistema 9: Incubadora de 16 L con entrada de agua a través de platos cóncavos.....	58
9.2.10	Sistema 10: Incubadora de 16 L con filtro de desagüe implementando botella plástica y aeración.....	59
9.2.11	Sistema 11: Incubadora de 16 L con entrada de agua en forma de regadera en PVC.....	60
9.2.12	Sistema 12: Incubadora de 16 L con filtro de esponja en el desagüe.....	61
9.2.13	Sistema 13: Incubadora de 16 L con desagüe de esponja y tamiz .....	62

9.2.14	Sistema 14: Incubadora de 16 L con desagüe de esponja y media velada .....	63
9.3	SISTEMA DE LEVANTE DE CRÍAS PARA LOS BIOENSAYOS DE DENSIDAD .....	68
9.4	BIOENSAYOS DE DENSIDAD .....	69
9.4.1	Monitoreo de la calidad de agua.....	69
9.4.2	Supervivencia .....	70
9.4.3	Crecimiento.....	73
<b>10</b>	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>75</b>
10.1	SISTEMAS PARA LEVANTE DE CRÍAS.....	75
10.2	BIOENSAYO DE DENSIDAD.....	77
<b>11</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>80</b>
<b>12</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>81</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Caballitos de mar comercializados en el mercado internacional. (Imagen: Oeser, 2005).....	24
Figura 2. Sistema de circulación del LABBIP (Imagen: M. Sánchez, 2009).....	27
Figura 3. Parejas de reproductores de <i>H. reidi</i> del LABBIP.....	30
Figura 4. Proceso de colecta y siembra de crías de <i>H. reidi</i> del tanque de reproductores a las incubadoras.....	33
Figura 5. Tanque de cultivo de rotíferos <i>B. plicatilis</i> y detalle del proceso de limpieza.....	37
Figura 6. Procedimiento para la cosecha de <i>Artemia franciscana</i> . ....	38
Figura 7. Aplicación de anestesia durante el muestreo de crías de <i>H. reidi</i> . ....	40
Figura 8. Esquema para el levante y mantenimiento en laboratorio de crías de <i>H. reidi</i> durante el primer mes de vida.....	42
Figura 9. Supervivencia de crías de <i>H. reidi</i> alimentadas con dos dietas la primera semana de vida.....	44
Figura 10. Protocolo de anestesia y mediciones en crías de una semana de edad de <i>H. reidi</i> . ....	45
Figura 11. Sistema 1: Acuario de 25 L para levante de crías de <i>H. reidi</i> . ....	47
Figura 12. Sistema 2: Balde de 18 L con recubrimiento de malla en la parte superior.....	48
Figura 13. Crías de <i>H. reidi</i> sin enfermedad de la burbuja (A), y con enfermedad de la burbuja (B). ....	49
Figura 14. Sistema 3a. Incubadoras plásticas 3,5 L para mantener crías de <i>H. reidi</i> . ....	50
Figura 15. Sistema 3b. Recipiente de plástico cilíndrico de 3,5 L.....	51
Figura 16. Sistema 3c: recipiente cilíndrico de 3,5 L con tapa.....	51
Figura 17. Sistema 4: Incubadora de 3,5 L para el levante de crías de <i>H. reidi</i> .....	52



Figura 18. Sistema 5. Incubadora de 12 L. para levante de crías de <i>H. reidi</i> . ....	53
Figura 19. Sistema 6: Incubadora de 16 L para el levante de crías de <i>H. reidi</i> con filtro de cascajo (A), detalle del recipiente plástico para la entrada de agua (B)....	55
Figura 20. Sistema 7. Desagüe, con tamiz de 150 $\mu\text{m}$ , para el levante de crías de <i>H. reidi</i> . ....	56
Figura 21. Sistema 8: Incubadora con desagüe de botella de 250 mL (A), detalle del filtro (B).....	57
Figura 22. Sistema 9: Incubadoras de 16L para levante de crías de <i>H. reidi</i> , con entrada de agua a través de platos cóncavos (A), detalle del plato (B). ....	58
Figura 23. Sistemas 10: Desagüe con botella plástica de 250 mL y mangueras de aeración. ....	60
Figura 24. Sistema 11: Entrada de agua en forma de regadera, para el levante de crías de <i>H. reidi</i> .....	61
Figura 25. Sistema 12: Desagüe con adaptación de esponja para el levante de crías de <i>H. reidi</i> .....	62
Figura 26. Sistema 13: Desagüe con filtro de esponja y recubrimiento de tamiz de 150 $\mu\text{m}$ , para el levante de crías de <i>H. reidi</i> . ....	63
Figura 27. Sistema 14: Incubadora de 16 L con filtro de esponja y media velada. ....	64
Figura 28. Supervivencia de crías de caballito de mar en las diferentes incubadoras. ....	65
Figura 29. Sistema de incubadoras para el levante de crías de <i>H. reidi</i> . ....	68
Figura 30. Comportamiento de la temperatura (A), oxígeno (B), pH (C) y salinidad (D) del agua durante los ensayos realizados. ....	69
Figura 31. Supervivencia de las crías de <i>H. reidi</i> , para los tres ensayos de densidad. Ensayo uno: 1, 3 y 8 ind.L <sup>-1</sup> (A); ensayos dos y tres: 1, 3 y 6 ind.L <sup>-1</sup> (B y C). ....	72

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Dietas suministradas a crías de <i>H. reidi</i> durante los primeros seis días de vida. ....	31
Tabla 2. Distribución de crías de <i>H. reidi</i> para los tres ensayos de densidades de siembra. ....	32
Tabla 3. Esquema de alimentación para las crías de <i>H. reidi</i> durante los bioensayos de densidad. ....	35
Tabla 4. Parámetros fisicoquímicos recomendados para el cultivo de <i>H. reidi</i> (Ospina-Salazar <i>et al.</i> , 2011). ....	39
Tabla 5. Concentraciones de anestesia experimentales para crías de <i>H. reidi</i> de una semana de vida.....	46
Tabla 6. Evaluación de los sistemas de incubadoras implementados para el levante de crías de <i>H. reidi</i> de acuerdo con diferentes criterios cualitativos.....	66
Tabla 7. Parámetros de crecimiento y supervivencia en crías de <i>H. reidi</i> a diferentes densidades de siembra.. ....	73

## RESUMEN

Se evaluaron 14 diferentes diseños de incubadoras y tres densidades de siembra para el levante de crías recién nacidas de caballitos de mar *H. reidi*. Dos sistemas fueron los más efectivos: uno con una incubadora circular de 12 L con cinco entradas de agua y otro cilíndrico de 16 L con sistema de regadera en la entrada y esponja con malla y media velada en el desagüe. Presentando un 18,8 y 66,6% de supervivencia respectivamente, después de ocho días de muestreo; en estos sistemas las crías no presentaron problemas por afección de burbuja, succión por el filtro de salida y la cantidad de alimento suministrado permaneció por mucho más tiempo dentro de las incubadoras. Posteriormente, usando el sistema de 16 L, se realizaron tres ensayos de densidad de siembra para el levante de crías; el primero con 1, 3 y 8 ind.L<sup>-1</sup> por ocho días; el segundo y tercero con 1, 3 y 6 ind.L<sup>-1</sup> durante nueve y 13 días respectivamente, obteniendo como resultado que la densidad de 1 ind.L<sup>-1</sup> presentó mayor supervivencia (21,4%) que las de 3 y 6 ind.L (6,3 y 11,1% respectivamente), sin embargo no se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos ( $H_{cal}=1,90 < H_{Tab(0,05,2)}=5,99$ ). Con respecto al crecimiento en términos de peso, los mayores valores se registraron en el tratamiento de 6 ind.L<sup>-1</sup>, en peso ganado se observó que los animales incrementaron 1,64 veces más su peso inicial, mientras que en 1 y 3 ind.L<sup>-1</sup> solamente aumentó entre 1,18 a 1,37 veces respectivamente. La ganancia de peso individual registró que diariamente los animales crecieron entre 0,25 - 0,36 mg, partiendo de un peso inicial al nacer de 1,75 mg, el cual fue duplicado en todos los tratamientos a los 13 días de vida y casi triplicado en el tratamiento de 6 ind.L<sup>-1</sup>. La tasa específica de crecimiento se mantuvo entre 1,28 y 1,43 a los ocho días del ensayo; así mismo, aunque la densidad de 6 ind.L<sup>-1</sup> presentó la mayor ganancia de peso, también presentó los porcentajes más bajos de supervivencia. Este es el primer trabajo en densidades de siembra que se realiza en crías de caballitos de mar recién nacidas del género *Hippocampus*.

*Palabras clave: Hippocampus reidi, sistemas de levante, incubadoras, densidades de siembra.*

## ABSTRACT

14 Incubator systems were designed and three stock densities were evaluated to raise *Hippocampus reidi* fry, using newly spawned lots. Two system were most effective, one was a 12 L circular incubator whit five innings of water, and another one a 16 L cylindrical incubator with sprinkler input system and sponge with mesh system in drain, with 18,8 and 66,6% of survival respectively, after eight days of sampling; in these system the fry doesn't have bubble disease, suction by the output filter, and the amount of food provided remains longer in the incubators. Thereafter, using the 16 L system, three experiments of optimal density to raise fry during the first month were performed, the stocking densities were 1, 3 and 8 ind.L<sup>-1</sup> for an eight days period; 1, 3 and 6 ind.L<sup>-1</sup> for nine days and 1, 3 and 6 ind.L<sup>-1</sup> for 13 days, the results shows that 1 ind.L<sup>-1</sup> density had higher survival (21,4%) than 3 and 6 ind.L<sup>-1</sup> (6,3 and 11,1% respectly); however not significantly difference were founded between treatments ( $H_{cal} = 0,41 < H_{Tab(0,05,2)} = 5.99$ ). According with growth, the highest data were in 6 ind.L<sup>-1</sup> treatment. In gain weight was observed that animals increased 1,64 times their initial weight, while in 1 and 3 ind.L<sup>-1</sup> only increased between 1,18 to 1,37 times respectively. The individual gain weight shows that daily the animals grew between 0,25 – 0,36 mg starting at birth with 1,75 mg initial weight, which was duplicated in all treatments at 13<sup>th</sup> day, and almost triplicate in 6 ind.L<sup>-1</sup> treatment. The specific growth rate was between 1,28 and 1,43 at eight experiment days; although the 6 ind.L<sup>-1</sup> density shows the higher gain weight, also present the lowest survival percentages. This is the first work in newborn seahorses stock densities of *Hippocampus* genus.

*Keywords: Hippocampus reidi, raise systems, incubator, stock densities.*

## 1 PRESENTACIÓN

Uno de los grandes desafíos que enfrenta la piscicultura, es la introducción de nuevas especies a los sistemas productivos (Lopes *et al.*, 2001; Segura *et al.*, 2004). En esta búsqueda de organismos con potencial económico se encontró que los caballitos de mar, tiene una alta demanda en el mercado como alimento exótico, insumo de la medicina tradicional china o como ornamental (Vincent, 1995); lo cual sumado a su vulnerabilidad por sus características ecológicas, su hábitat en continua disminución y las restricciones comerciales surgidas por los datos de reducción poblacional, lo convierten en una especie de interés tanto para su uso sostenible como para repoblación con los correspondientes estudios ecológicos.

En este estudio se abordaron dos aspectos claves en acuicultura: la densidad y el diseño de los sistemas de mantenimiento para el cultivo de *Hippocampus reidi*; para ello se evaluaron tres densidades de siembra y sus efectos en la ganancia en peso y supervivencia en crías de caballitos de mar durante las primeras semanas de vida. Además se describe el diseño de los sistemas de levante, estableciendo las técnicas para el mantenimiento de las crías durante esta etapa de crecimiento. Estas investigaciones constituyen el punto de partida para el levante en cautividad de crías de caballitos; para lograr a mediano plazo su producción a escala comercial y potencialmente tratar de cubrir la demanda del mercado. Además con la información generada, se busca mitigar el impacto provocado por la captura en el medio natural, se favorece la conservación, reduciendo la presión sobre los ecosistemas marinos y permitiendo que las poblaciones se recuperen naturalmente y mejorando las posibilidades de preservación de la especie.

El cultivo de *H. reidi* puede convertirse en una opción productiva, al generar empleos alrededor del cultivo y comercialización, actividades que tienen gran potencial económico tanto por el alto costo de los ornamentales, como por el valor agregado de ser un producto acuícola que incursiona en los mercados verdes.

## 2 PLANTEAMIENTO DE LA PREGUNTA Y JUSTIFICACIÓN

La acuicultura marina ornamental se está convirtiendo rápidamente en una empresa económicamente viable y un tema de interés para la comunidad ambiental y la investigación (Hoegh y Smith, 1989).

El suministro de organismos marinos para el mercado de la acuarofilia se ha basado fundamentalmente en la captura directa del medio natural, lo cual ha originado algunos problemas relacionados con la conservación tanto de estos organismos como de los ecosistemas de los que forman parte (Dayton, 1995; Lin y Zhang, 2001). A pesar de la expansión del mercado de ornamentales, muy pocas especies son actualmente cultivadas, en especial los peces marinos; de acuerdo con el programa ambiental de las Naciones Unidas UNEP-WCMC (2003), sólo un 10% de éstos se reproducen en cautiverio y aún menos especies son cultivadas con fines comerciales (Wabnitz *et al.*, 2003).

La explotación irracional para usos como medicina tradicional china, acuarismo y las capturas incidentales de muchos organismos marinos ha ocasionado fuertes caídas de las poblaciones naturales en los últimos años, un ejemplo de ello son las especies de caballito de mar, las cuales están catalogadas como vulnerables o con datos insuficientes en la lista roja de especies amenazadas (IUCN, 2008), llegando incluso a restringirse la comercialización de la mayoría de las especies del género (CITES, 2008), esto ha despertado el interés por la conservación, el manejo e incluso, el uso sustentable de éstas y otras especies amenazadas, lo cual ha generado una serie de interrogantes sobre su biología y conservación (Woods, 2002).



Uno de los problemas más comunes que se ha encontrado en los intentos por cultivar caballitos de mar es el mantenimiento de las crías durante las primeras semanas de vida, a causa de diversos factores como la alimentación, manejo de los organismos en condiciones de laboratorio, parámetros fisicoquímicos óptimos para su desarrollo, sistemas de levante adecuados y la densidad de siembra (Scaratt, 1995), siendo estos dos últimos factores el enfoque de la actual investigación.

En el Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras – INVEMAR., se vienen adelantando una serie de investigaciones en el marco del proyecto “Iniciación al proceso de reproducción de dos especies de peces marinos ornamentales de interés comercial, *Gramma loreto* e *Hippocampus reidi*, en condiciones de laboratorio”, financiado por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, tendientes a desarrollar la tecnología de cultivo para el levante de estas especies. De acuerdo con las observaciones realizadas durante la evaluación del efecto de la temperatura y la salinidad en la supervivencia y crecimiento de crías de *Hippocampus reidi*, en cautiverio (Melo, 2010), se vio la necesidad de estudiar y estandarizar la densidad de siembra, ya que este factor, al igual que el diseño de un sistema de levante que garantice el mejor manejo de las crías y le proporcione condiciones similares a las del ambiente, pueden llegar a ser factores determinantes para el levante de los organismos en condiciones de cautividad, que influyen en la supervivencia, crecimiento y aprovechamiento del alimento (González *et al.*, 2004), de ahí el interés de encontrar el equilibrio entre el bienestar de los organismos y la eficiencia en el manejo.

En este trabajo se diseñó un sistema de cultivo y se evaluó el efecto de la densidad de siembra sobre el crecimiento y supervivencia, en crías de *Hippocampus reidi*, durante el primer mes de vida.

### 3 ANTECEDENTES

En algunos peces marinos de consumo, se ha demostrado que la densidad de siembra afecta tanto el crecimiento como la supervivencia en larvas (Houde, 1975; Tucker, 1998; Montero *et al.*, 1999). En la cobia (*Rachycentron canadum*) y el lenguado (*Paralichthys dentatus*), se observa que a densidades mayores de 10 larvas.L<sup>-1</sup> el crecimiento y la supervivencia disminuyen (King *et al.*, 2000; Hitzfelderg *et al.*, 2006; Benneti *et al.*, 2008). Para el cultivo larvario intensivo del dentón común (*Dentex dentex*) se recomiendan densidades de siembra de 10 a 40 larvas.L<sup>-1</sup> (Giménez y Estévez, 2008); en otras especies como la cabrilla arenera (*Paralabrax maculatofasciatus*) y la lubina (*Dicentrarchus labrax*) se ha reportado que soportan densidades mayores a 50 larvas.L<sup>-1</sup> (Álvarez-González *et al.*, 2001; Conides y Glamuzina, 2001).

En muchos de los trabajos realizados en crías y juveniles de caballitos la densidad de siembra utilizada, así como los sistemas de levante implementados, no son un factor determinante de las investigaciones, sin embargo pueden proveer información útil para conocer los estándares de manejo en los diferentes cultivos. Por ejemplo: Reyes-Bustamante y Ortega-Salas (1999) y Ortega-Salas y Reyes-Bustamante (2006), estudiaron la fecundidad, supervivencia y crecimiento del caballito de mar *H. ingens* bajo condiciones controladas, utilizando densidades de 3,3 y 0,2 ind.L<sup>-1</sup>, alimentándolas con una mezcla de rotíferos y artemias observando que el éxito de obtener por lo menos 50% de supervivencia a talla comercial, depende de una buena calidad de agua y cantidad de alimento vivo. Wong y Benzie (2003), evaluaron los efectos de la temperatura, el enriquecimiento de artemia, la densidad de siembra y la intensidad de la luz sobre el crecimiento de juveniles de caballitos de mar *H. whitei* durante 107 días, para el experimento

utilizaron densidades de 0,5 y 1 ind.L<sup>-1</sup>, obteniendo como resultado que la tasa de crecimiento alrededor de tres meses de edad se incrementó 0,14 mm, con una temperatura de 26°C y que el uso de artemia enriquecida con DC Selco® mejora la tasa de crecimiento, sin observar efectos importantes con las densidades de siembra usadas. Woods (2003a), investigó el efecto de la densidad y la segregación de género en el crecimiento y la supervivencia de *H. abdominalis*, en densidades de 1,2 y 5 ind.L<sup>-1</sup>, durante 60 días, observando que el crecimiento es inversamente proporcional a la densidad; no se presentaron diferencias en la supervivencia en los tratamientos con 1 y 2 ind.L<sup>-1</sup> (100 y 95,8% respectivamente), mientras que en el tratamiento de 5 ind.L<sup>-1</sup> se redujo significativamente (78,3%). Martínez-Cárdenas y Purser (2007), estudiaron el efecto de los colores en los tanques, la actividad alimenticia, el crecimiento y la supervivencia en crías de *H. abdominalis* a una densidad de 1 ind.L<sup>-1</sup> encontrando que no hay diferencias significativas entre cualquiera de los parámetros de la prueba.

González *et al.* (2004), utilizaron densidades de 3,5 ind.L<sup>-1</sup> en *H. reidi*, e investigaron acerca de aspectos biológicos de la especie, determinando la edad de diferenciación sexual, la talla de primera maduración y la proporción por sexos. La tasa de crecimiento varió entre 2,2 y 0,9 cm.mes<sup>-1</sup> durante el período de experimentación. Sheng *et al.* (2007), investigaron el efecto de inanición en el crecimiento y la supervivencia de *H. trimaculatus* y *H. kuda*, sembrándolos a una densidad de 7,5 ind.L<sup>-1</sup>, encontrando que los juveniles de *H. trimaculatus* alcanzaron el punto de no retorno a las 116,7 h posparto, mientras que *H. kuda* lo hizo a las 115,6 h; la tasa de supervivencia del grupo de 24 h de ayuno de *H. trimaculatus* fue la más alta (80,8 ± 2,9%). Hora y Joyeux (2009), utilizaron densidades de 4,1, 1,6 y 0,8 ind.L<sup>-1</sup> con *H. reidi*, los resultados indican que la especie puede ser criada en cautiverio desde el nacimiento hasta la edad adulta con una tasa de crecimiento relativamente rápida, baja mortalidad y principios de madurez sexual, por lo tanto, su uso potencial en la acuicultura puede ser una

iniciativa hacia su conservación. Lin *et al.* (2010), examinaron en juveniles de *H. erectus* los efectos de la intensidad lumínica, densidad poblacional y temperatura sobre la enfermedad de la burbuja de aire, estimando la supervivencia y el crecimiento, encontrando que no hubo un efecto significativo de la densidad en la tasa de la enfermedad de burbuja de aire; los juveniles cultivados a 1 ind.L<sup>-1</sup> presentaron el mayor incremento en peso ( $0,134 \pm 0,031$  g), mientras que a 2 ind.L<sup>-1</sup> se obtuvo el mayor incremento en longitud estándar ( $3,17 \pm 0,30$  cm) y los caballitos cultivados a 1,5 ind.L<sup>-1</sup> tuvieron la mayor supervivencia ( $86,1 \pm 4,6\%$ ), sugiriendo las densidades de 1 y 2 ind.L<sup>-1</sup> como las adecuadas para su cultivo. El resultado de la interacción de la intensidad de la luz y la temperatura mostró que los juveniles cultivados a 1.500 lux y 26°C tuvieron una ganancia en peso y una tasa de crecimiento específica más altas. Murugan *et al.* (2009), estudiaron la reproducción y cría a gran escala de caballitos de mar *H. trimaculatus* bajo condiciones de cautiverio, utilizando una densidad de 1 ind.L<sup>-1</sup>, observando que la supervivencia de los juveniles criados durante la fase pelágica con tres diferentes intensidades de luz (1.000, 1.500 y 2.000 lux) difieren significativamente ( $P < 0,05$ ), siendo 2.000 lux los que presentan la más alta supervivencia ( $77,3 \pm 3,1\%$ ), obteniendo una tasa de supervivencia al final de 26 semanas del 65%. Lin *et al.*, (2009), investigaron el efecto de la intensidad de la luz, densidad de siembra, frecuencia alimenticia y salinidad óptima en el crecimiento de sub-adultos de *H. erectus*, estableciendo que la tasa de crecimiento disminuyó con el aumento de la densidad (0,25, 0,5, 1 y 1,5 ind.L<sup>-1</sup>, respectivamente), también recalcan que una intensidad de luz adecuada y frecuencia de alimentación pueden mejorar la tasa de crecimiento de los caballitos de mar.

Los sistemas de cultivo desempeñan un rol muy importante para el mantenimiento de los organismos, muchas veces no importa el número de animales que se siembre, si el sistema no es efectivo los resultados no son favorables. Aunque ingenieros, científicos, y acuicultores hayan tenido éxito al realizar los procesos

mecánicos, químicos y biológicos que aseguran la salud y la supervivencia de numerosos organismos acuáticos (Hoegh y Smith, 1989), como en cualquier proceso de diseño para acuicultura, las características de la especie son clave para la determinación de los criterios del sistema. En el caso de los caballitos de mar, la especie *H. reidi* presenta una fase pelágica hasta los 30 días de vida, la cual es considerada crítica ya que allí, especialmente los primeros cinco días, es en donde se presenta la mayor mortalidad en cautiverio; una vez superada esta etapa, los animales pasan a una fase bentónica en la cual se requieren menos cuidados para garantizar el éxito del cultivo (Payne y Rippingale, 2000). Giraldo y Polonia (2005), evaluaron tres sistemas de levante para crías de esta especie, el primero consistió en una jaula flotante, el segundo en dos acuarios de 20 L en recirculación y el tercero en dos tanques de 500 L, utilizando una densidad de 3 ind.L<sup>-1</sup>, la experiencia con la jaula flotante no fue satisfactoria, ya que todos los caballitos murieron al cabo de siete días; a las cuatro semanas se obtuvo una supervivencia del 2,42% para el sistema de 20 L con recirculación y 0,9 y 6,6% para los dos tanques de 500 L.

Underwood (2010), trabajó en el diseño de un acuario para levante de crías de *H. erectus*, utilizando un desagüe central recubierto por una esponja, la forma y el movimiento del agua en el tanque de 68 L le permitieron obtener un flujo laminar y circular que mantiene a los organismos en continua suspensión siendo el principio básico de los acuarios tipo Kreisel (Koldewey, 2005); aunque el sistema no impedía que los organismos floten, sí los forzaba suavemente a regresar al fondo. Chamorro y Planas (2008) y Planas *et al.* (2008), trabajaron con *H. guttulatus* evaluando cuatro unidades experimentales independientes, fabricadas con paneles verticales de metacrilato, cada unidad estaba dotada de filtro mecánico, químico, biológico, sistema de bombeo, sistema de iluminación, programación horaria y enfriamiento del agua, la entrada de agua fue sub-superficial para eliminar las posibles burbujas que se forman al bombear agua; el diseño y

funcionamiento de estos acuarios fue adecuado, práctico y versátil para el mantenimiento y ensayos de reproducción, presentando los mejores resultados para la especie.

Teniendo como referencia los trabajos realizados, se evidencia la importancia de fabricar un sistema adecuado para las crías de *H. reidi* que les proporcione las mejores condiciones a los organismos y determinar si la densidad de siembra tiene algún efecto en su crecimiento, ya que a menores densidades se presentan mejores porcentajes de supervivencia, ganancia en peso y crecimiento, pero a nivel de costos de producción puede llegar a ser económicamente inviable (Tucker 1998; Álvarez-Lajonchère y Hernández-Molejón, 2001). En general, estas consideraciones pueden resumirse en una dinámica de interacciones entre la densidad de caballitos, los sistemas de levante utilizados y sus consecuencias sobre el crecimiento, supervivencia, conversión alimenticia y heterogeneidad de tamaño (Lazard *et al.*, 2009).

## 4 MARCO TEÓRICO CONCEPTUAL

Los caballitos de mar del género *Hippocampus* pertenecen a la familia Syngnathidae (Wilson y Vincent, 1998) y comprende cerca de 35 especies en todo el mundo. Suelen vivir en lugares en los que pueden ocultarse fácilmente como zonas pobladas por macroalgas, pastos marinos y arrecifes de coral, los cuales utilizan como defensa; dado que su nado es muy lento, adoptan una posición erecta impulsándose con su aleta dorsal y se agarran de tallos y plantas subacuáticas con su cola prensil (Carpio y Cabello, 2009).

La historia de vida de estos organismos es una de las más curiosas en el reino animal, de hecho la característica de tener la cabeza en ángulo recto con el resto del cuerpo no se da en ningún otro género de peces. La reproducción es también un acontecimiento extraordinario ya que el macho es el que incuba los huevos y una vez desarrolladas las crías en su vientre, da a luz por lo general en las primeras horas de la mañana o muchas veces cuando aún está oscuro; una vez que nacen, las crías miden de 6 a 12 mm de longitud y deben sobrevivir por su cuenta (Olivotto *et al.*, 2008; Carpio y Cabello, 2009).

La falta de cuidado parental es uno de los principales problemas para la supervivencia en el medio natural, como también lo es la extracción de 25 millones de caballitos de mar por año, utilizados como principio básico en la medicina tradicional China desde hace por lo menos 400 años, en acuarios y artesanías (Figura 1), provocando una disminución notable en las poblaciones naturales (Vincent, 1995; Fenner, 1998; Hargrove, 1998). De ahí el interés por cerrar el ciclo de vida del caballito de mar en cautividad; para aprovechar el potencial económico y reducir el impacto ecológico que genera la extracción; sin embargo, es necesario

seguir investigando y afianzando aún más el conocimiento en el cultivo de ornamentales marinos ya que esta es una industria relativamente nueva que aunque tiene un gran potencial, debe resolver muchos inconvenientes para que pueda ser viable (Giwojna y Giwojna, 1999; Foster y Vincent, 2004).



Figura 1. Caballitos de mar comercializados en el mercado internacional. (Imagen: Oeser, 2005).

Como se mencionó anteriormente, uno de los principales cuellos de botella en el cultivo del caballito mar es la baja tasa de supervivencia de las crías en las primeras semanas de vida (Scaratt, 1995; Payne y Rippingale, 2000), probablemente asociado al desconocimiento de su fisiología y mantenimiento en cautiverio. Algunas especies del género *Hippocampus*, entre ellas *H. reidi*, presentan una fase pelágica en las primeras semanas de vida (González *et al.*, 2004), esto en condiciones de laboratorio conlleva a que la mayoría de las crías mueran por captación de aire atmosférico al quedar atrapadas en la superficie del agua, siendo necesario romper la tensión superficial para impedir su acenso a la superficie. Aunque la enfermedad de la burbuja de aire es una de las principales causas de mortalidad en todos los estadios de vida de los caballitos de mar, generalmente cuando los sistemas no son efectivos las crías son las más propensas a padecer de esta enfermedad (Woods, 2000), por lo tanto el diseño de sistemas de levante es fundamental para el mantenimiento de los organismos; uno



de los sistemas utilizados para el cultivo de caballitos, son los acuarios tipo Kreisel (Koldewey 2005), donde los organismos se encuentran en continua suspensión, existen también acuarios de forma cilíndrica diseñados inicialmente para el cultivo de anemonas y medusas, en donde el tipo de circulación mantiene alejado a los organismos de la superficie (Lecompte, 2010), cumpliendo con uno de los criterios para el cultivo de caballitos.

La densidad de siembra en sistemas intensivos de cultivo de peces también puede lograr optimizar la productividad en el menor espacio posible; sin embargo, el crecimiento en esta forma de cultivo es bajo, presentándose una mayor incidencia de enfermedades. Muchas investigaciones se han centrado en la evaluación de los efectos de la densidad en crías de peces, estimando variables como crecimiento, supervivencia y comportamiento, estas variables pueden ser negativas, positivas, o pueden no presentar efecto evidente, ya que parece ser específico de cada especie (Holm *et al.*, 1990; Björnsson, 1994; Goudie *et al.*, 1994; Siddiqui y Al-Harbi, 1997; Baras, 1999), de ahí la importancia de determinar los efectos que pueden tener las densidades de siembra al cultivar crías de *H. reidi*.

Este trabajo evaluó el rol de las densidades de siembra y sistemas de levante para *Hippocampus reidi*, parámetros que han sido poco estudiados y que podrían ayudar a mejorar la supervivencia en cautiverio.

## 5 OBJETIVOS

### 5.1 OBJETIVO GENERAL:

Evaluar diferentes sistemas de acuarios y la densidad óptima de siembra para el levante de crías de caballitos de mar *H. reidi* y aportar información que permita mejorar el manejo de los organismos en temas de alimentación y toma de medidas durante los muestreos.

### 5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Estandarizar un protocolo adecuado para la alimentación de las crías durante la primera semana de vida y un protocolo de manejo durante los muestreos, ensayando diferentes concentraciones de anestesia.
- Diseñar un sistema de incubadoras para el levante de crías de *H. reidi* mediante la construcción y evaluación de diferentes modelos y la realización de ajustes técnicos.
- Evaluar el crecimiento y supervivencia de las crías de caballito de mar, cultivadas a tres diferentes densidades de siembra.

## 6 DISEÑO METODOLÓGICO

Este trabajo se realizó en las instalaciones del Laboratorio de Bioprospección Marina del INVEMAR - LABBIP, ubicado en la ciudad de Santa Marta, en el marco del proyecto: “Iniciación al proceso de reproducción de dos especies de peces marinos ornamentales de interés comercial *Gramma loreto* e *Hippocampus reidi* en condiciones de laboratorio”.

### 6.1 INFRAESTRUCTURA

El LABBIP está diseñado para realizar bioensayos en el área de maricultura y bioactividad, cuenta con un área de bioensayos, mantenimiento de reproductores, levante de crías y cultivo de alimento vivo (Figura 2).

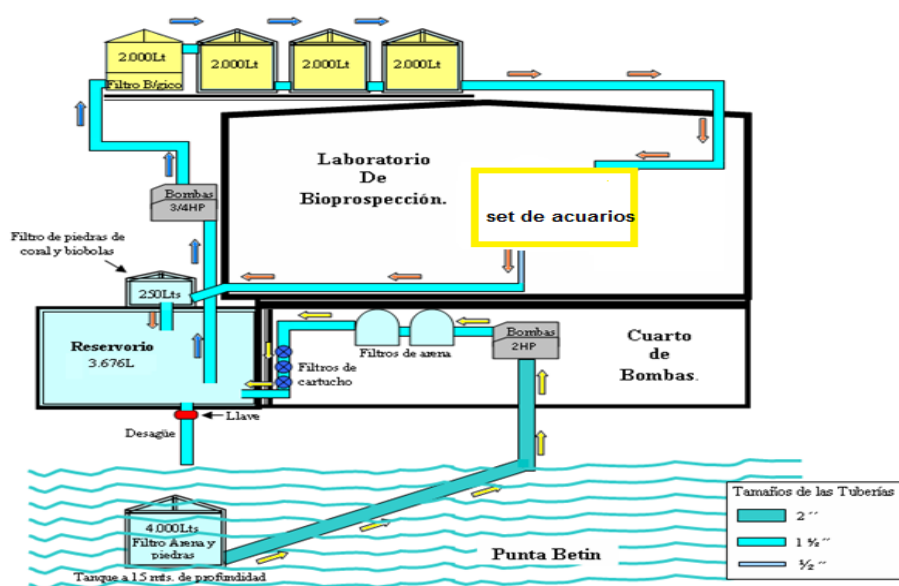


Figura 2. Sistema de circulación del LABBIP (Imagen: M. Sánchez, 2009).

El agua es tomada del mar a través de un filtro de arena instalado a 15 m de profundidad, pasa por filtros de arena y de cartucho y se almacena en un reservorio con capacidad para 3.676 L. Desde el reservorio el agua es bombeada a los tanques elevados de almacenamiento ubicados a una altura de seis metros, e ingresa al laboratorio por gravedad y retorna al reservorio para continuar el ciclo. Es un sistema cerrado en el cual se adiciona agua de mar para hacer recambios y reposición (Figura 2).

## **6.2 DISEÑO DE INCUBADORAS PARA LEVANTE DE CRÍAS**

Teniendo en cuenta la fase pelágica que se presenta en esta especie, los sistemas de levante deben cumplir cada uno de los siguientes criterios de diseño, algunos de ellos correspondientes a los acuarios tipo Kreisel (Underwood 2010; Koldewey, 2005):

**Romper la tensión superficial del agua:** este es el principio básico del sistema, con lo cual se pretende evitar que los caballitos permanezcan en la superficie y capten aire atmosférico, lo cual les produce burbujas en su cuerpo, aumenta la flotabilidad, dificulta el nado y la captura del alimento y causa finalmente la muerte.

**Permitir la circulación del agua** con el fin de generar una corriente suave y de forma circular dentro de la incubadora que evite los espacios muertos y que obligue a que las crías se mantengan en la columna de agua, y no atrapadas en la superficie; se debe establecer un sistema de entrada y salida del agua de forma suave que renueve el agua del recipiente pero que no cree una corriente muy fuerte que succione a los organismos.

**Retener los organismos y el alimento:** se logra con un filtro que permita la salida del agua para el recambio y actúe reduciendo la fuerza de salida para evitar que las crías queden atrapadas y al mismo tiempo retenga el alimento

suministrado para que permanezca el mayor tiempo posible dentro de la incubadora, aumentando el tiempo en el que los organismos pueden alimentarse.

A partir de las características anteriormente establecidas, se utilizó material de fácil consecución, fabricando 14 propuestas de incubadoras. Para la evaluación de cada diseño se sembraban dentro de las incubadoras crías recién nacidas, cada incubadora era evaluada por el cumplimiento o no de una serie de criterios cualitativos que se establecieron: 1) Control de flotabilidad, es decir que las crías no se mantuvieran en la superficie, 2) Control de atrapamiento, que las crías no fueran succionadas o quedaran atrapadas en el sistema de desagüe, 3) Supervivencia de las crías, que no se originara la mortalidad de todo el lote, 4) Facilidad de limpieza del sistema, 5) Retención de alimento, que el sistema de desagüe permitiera que el alimento se quedara el tiempo suficiente para que las crías se pudieran alimentar.

Adicionalmente, 10 sistemas fueron evaluados cuantitativamente con el fin de determinar los porcentajes de supervivencia de las crías durante la primera semana de vida, registrando diariamente la mortalidad en cada sistema y calculando:

$$\text{Supervivencia (\%)} = 100 * [(\text{ind. iniciales} - \text{ind. muertos}) / \text{ind. Iniciales}].$$

### **6.3 MANTENIMIENTO DE REPRODUCTORES Y ENSAYOS PREVIOS PARA LA ALIMENTACIÓN Y MANEJO DE LAS CRÍAS**

Como preparación en el manejo y mantenimiento en crías de caballitos de mar se realizaron bioensayos previos al muestreo, para establecer las condiciones de manejo y alimentación necesarias.

### 6.3.1 Sistemas y mantenimiento de reproductores

La pareja de reproductores de *H. reidi* fue colectada en la bahía de Taganga y aclimatada en el LABBIP en un balde de 15 L con aeración y recambios constantes de agua durante quince días. Pasada esta etapa los caballitos fueron ubicados en un tanque plástico de 110 L que fue conectado al sistema de circulación del laboratorio (Figura 3).



Figura 3. Parejas de reproductores de *H. reidi* del LABBIP.

Cada tres días el tanque fue sifoneado para evitar la acumulación de materia orgánica en el fondo, además de limpiar las paredes con una esponja para controlar la fijación de anemonas que se adherían. La dieta de los reproductores contenía misidáceos, artemias adultas y larvas de guppys, el alimento se suministró en dos raciones diarias.

### 6.3.2 Ensayos previos con crías de caballitos de mar

#### 6.3.2.1 Alimentación durante la primera semana de vida

Para establecer la dieta a suministrar durante los primeros seis días de vida de las crías, se realizó un bioensayo de alimentación en el que se evaluaron a partir de los cultivos de alimento vivo que se mantienen en el laboratorio, dos tipos de dietas, una a base de artemia y otra donde se mezclaron rotíferos y artemias alternando las raciones en el día. Para el desarrollo de este bioensayo se utilizó un lote de 720 crías, distribuidas en tres botellones de 16 L (Tabla 1).

Tabla 1. Dietas suministradas a crías de *H. reidi* durante los primeros seis días de vida.

Botellón	No. crías /botellón	Dieta	Densidad de alimento	Ración/día
1	352	Rotíferos	20 rot.mL <sup>-1</sup>	3
		Artemia	5 art.mL <sup>-1</sup>	3
2	352	Artemia	5 art.mL <sup>-1</sup>	6

#### 6.3.2.2 Aplicación de anestesia

Para realizar las biometrías era necesario sacrificar a los caballitos, ya que las crías se maltrataban en el proceso de medición y pesaje por estar en continuo movimiento, además de aumentar el riesgo de que capturasen aire atmosférico. Con el fin de evitar su sacrificio, se desarrolló un ensayo para evaluar el anestésico Benzocaina, determinando el tiempo durante el cual las crías podían sumergirse en la solución sin matarlas, pero facilitando su manipulación durante el proceso de muestreo. Para este ensayo se prepararon dos concentraciones a partir de una solución de 1 g.L<sup>-1</sup>, para lo cual se tomaron dos frascos con 50 mL de agua de mar, adicionándoles 15 y 10 mL de la solución de benzocaina obteniendo una concentración de 0,3 y 0,2 mg.L<sup>-1</sup> respectivamente. Se utilizaron 10 crías de

caballitos de mar tomadas al azar de las incubadoras en las que se mantenían, cinco para cada concentración, las cuales una a una se introdujeron en la solución correspondiente, contabilizando el tiempo que era necesario para que la anestesia hiciera efecto en el animal, una vez dormidos, se tomaban con un asa de punta redonda, se secaban y se pesaban; obtenido el peso, la cría se trasladaba a un recipiente con agua de mar fresca y con el asa se empezaban a mover suavemente con el fin de despertarlas, contabilizando también este tiempo.

#### 6.4 BIOENSAYOS DE DENSIDAD

Después de seleccionar el mejor diseño de incubadora para el levante de las crías, se realizaron tres bioensayos con diferentes densidades de siembra (Tabla 2). El diseño experimental para cada uno constó de tres tratamientos evaluados por triplicado. En cada ensayo se utilizó una incubadora adicional en idénticas condiciones para cada tratamiento, con el fin de realizar reposiciones de los animales en caso de mortalidad durante los primeros cuatro días.

Tabla 2. Distribución de crías de *H. reidi* para los tres ensayos de densidades de siembra.

	Tratamiento	Densidad	Crías/Tanque	Total crías/ Tratamiento	Crías/Tanque de reposición	Total
Bioensayo 1	1	1 ind.L <sup>-1</sup>	16	48	16	64
	2	3 ind.L <sup>-1</sup>	48	144	48	192
	3	8 ind.L <sup>-1</sup>	128	384	128	512
Bioensayos 2 y 3	1	1 ind.L <sup>-1</sup>	14	42	14	56
	2	3 ind.L <sup>-1</sup>	42	126	42	168
	3	6 ind.L <sup>-1</sup>	84	252	84	336



## 6.4.1 Manejo de las crías

### 6.4.1.1 Colecta y siembra

La recolección de las crías recién nacidas se realizó por sifoneo en el tanque de reproductores, procedimiento que se lleva a cabo con una manguera plástica de 3/8" y un recipiente con agua, una vez se tenían todas las crías en el recipiente, se trasladaban hasta los sistemas y se sembraban al azar de acuerdo al número de individuos por tratamiento (Figura 4). Adicionalmente se tomaban 10 caballitos para determinar el peso promedio inicial del lote.

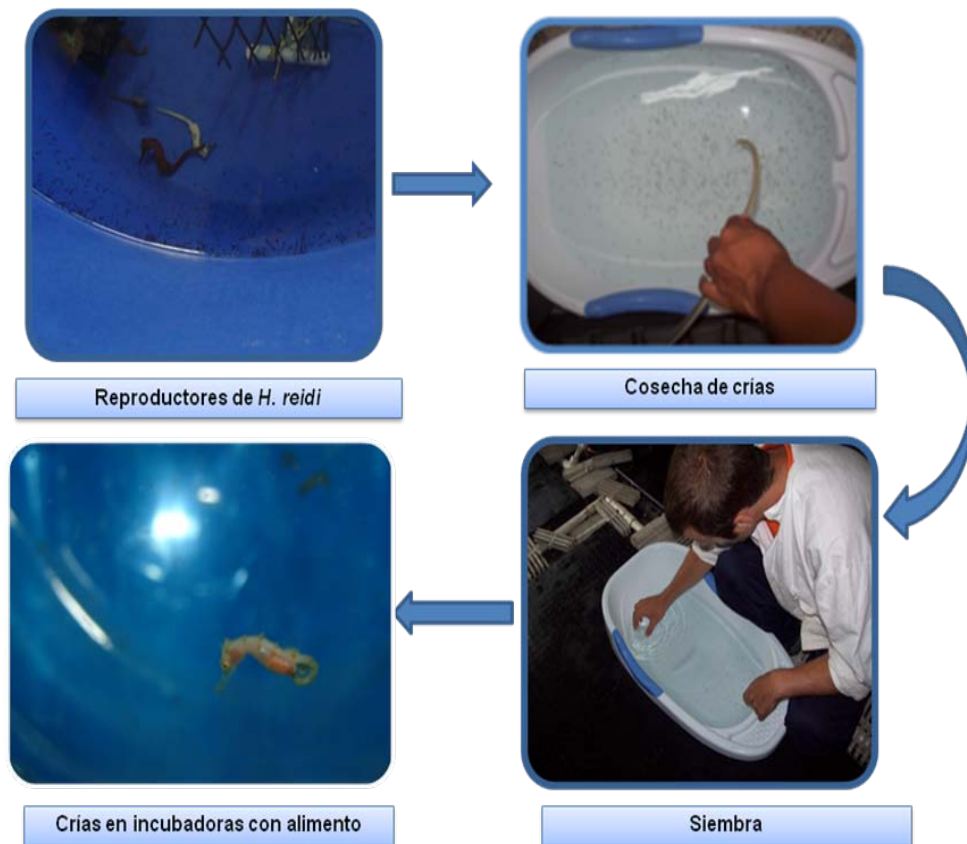


Figura 4. Proceso de colecta y siembra de crías de *H. reidi* del tanque de reproductores a las incubadoras.

#### **6.4.1.2 Reposición de organismos y control de la densidad**

Todas las mañanas durante los cuatro primeros días y después de la primera alimentación, se realizaban los registros de mortalidad en cada uno de los tratamientos, se sifoneaba y se realizaba la reposición de los organismos muertos en cada incubadora, esto se hacía con crías del mismo nacimiento que eran mantenidas en incubadoras con las mismas condiciones de cada tratamiento. Esta reposición se justifica en la necesidad de resolver dos inconvenientes, el primero relacionado con el volumen, puesto que manejar volúmenes demasiado bajos reduce la columna de agua aumentando el riesgo de mortalidad por burbuja y dificulta el proceso de alimentación y manejo, ya que se reduce el tiempo que el alimento está disponible, limita sus movimientos y en general entorpece el desarrollo de las crías; el segundo está relacionado con la supervivencia, porque los cuatro primeros días son críticos para esta especie y es donde ocurre la mayor mortalidad y disminuyen dramáticamente la población; por estas razones mantener la densidad adecuada durante los ensayos fue una tarea difícil de lograr. A partir del cuarto día se llevó un registro de los caballitos muertos en cada incubadora para calcular la supervivencia.

#### **6.4.2 Alimentación**

Las crías fueron alimentadas de cinco a seis veces al día de acuerdo con las especificaciones de la Tabla 3 y el mismo régimen de alimentación fue utilizado para los tres ensayos de densidad realizados. El alimento se seleccionó mediante diferentes tamices de acuerdo con el tamaño requerido.

Tabla 3. Esquema de alimentación para las crías de *H. reidi* durante los bioensayos de densidad.

Días	Dieta	Densidad/Ración	Número de raciones diarias	Tamaño del tamiz de selección (µm)
<b>0-6</b>	Rotíferos enriquecidos	20 rot.mL <sup>-1</sup>	3	40
	Nauplios recién eclosionados	5 art.mL <sup>-1</sup>	3	200
<b>7-14</b>	Nauplios	5 art.mL <sup>-1</sup>	6	≥200
<b>15-30</b>	Metanauplios enriquecidos	5 art.mL <sup>-1</sup>	5	≥200

Diariamente se realizó el mantenimiento de los cultivos de alimento vivo, estableciendo el número de organismos que se encontraban en las incubadoras, para de esta forma determinar la cantidad de alimento a preparar para el enriquecimiento de los cultivos y estimar el volumen de artemia y/o rotíferos requerido para alimentar a los caballitos; estas raciones variaron dependiendo del volumen y la densidad de animales que se encontraba en cada tratamiento.

#### 6.4.2.1 Protocolo para el cultivo y cosecha de alimento vivo

**Rotíferos:** Los rotíferos eran mantenidos en tanques blancos de 200 L, en fibra de vidrio a 26°C, pH ≥8 y 26 de salinidad, las variables fisicoquímicas eran monitoreadas diariamente a primera hora de la mañana. Adicionalmente se tomaba una muestra de 1 L, de donde se tomaba una alícuota de 1 mL para conocer la densidad del cultivo y el porcentaje de fertilidad mediante las siguientes fórmulas usadas por Ospina-Salazar *et al.*, (2011):

$$\text{Densidad (rot.mL}^{-1}\text{)} = \frac{\text{No. total de rotíferos} * \text{FD}}{\text{mL muestra}}$$

Donde:

FD = Factor de dilución (mL), sólo si fue necesario diluir la muestra.

$$\text{Fertilidad (\%)} = \frac{\text{No. hembras ovadas}}{\text{Densidad}} * 100$$

$$\text{Total rotíferos (x } 10^6) = \text{Densidad de rotíferos (rot.mL}^{-1}) * \text{Vol. tanque (L)} * 10^{-3}$$

Una vez conocida la densidad, se calculaba el volumen de rotíferos necesarios para alimentar a los caballitos en cada incubadora de acuerdo con la fórmula:

$$\text{Ración diaria} = \frac{\text{Volumen en la incubadora (mL)} * \text{Tasa de alimentacion (20 rot.mL}^{-1})}{\text{densidad de rotíferos (rot.mL}^{-1})}$$

Obteniendo el dato, se tomaba del cultivo el volumen necesario para alimentar, se retenían en un filtro de 60 µm y se enjuagaban varias veces con abundante agua antes de ser distribuidos en las incubadoras.

La limpieza del cultivo se realizaba cada día de por medio, para esto se quitaba la aeración, se frotaban las paredes del tanque con una esponja limpia sin jabón y se esperaba hasta que las partículas se concentraran en el fondo del tanque para luego sifonearlo y reponer el volumen. Dependiendo del estado del cultivo cada dos o tres días se realizaban recambios del 30 - 50% y cuando era necesario del 100%, para ello el volumen a recambiar se sifoneaba a través de un tamiz de 40 µm en una cama de agua donde se retenían los rotíferos, haciendo la reposición e integrando nuevamente los organismo colectados en el tamiz al cultivo (Figura 5).



Figura 5. Tanque de cultivo de rotíferos *B. plicatilis* y detalle del proceso de limpieza.

**Artemias:** Diariamente en horas de la tarde se colocaban dos tanques, con 12 L de agua preparada a una salinidad de 15, adicionando 12 g de quistes de artemia de la marca Artemia International®, con aeración fuerte e iluminación constante, pasadas 17 h se procedía a realizar la cosecha de los nauplios de la siguiente manera: se retiraba la aeración y después de 15 min cuando los quistes que no eclosionaron quedaban en la superficie, se hacía un sifoneo llevando las artemias por gravedad hasta un tamiz de 200  $\mu\text{m}$ , donde se retenían los huevos sobrantes y los nauplios de mayor tamaño, después de enjuagar con abundante agua se recogían los nauplios que pasaban por este filtro y eran retenidos en un tamiz de 125  $\mu\text{m}$  y posteriormente depositados en un volumen conocido de agua con suficiente aeración. Una vez se tenía la artemia en los botellones, se realizaba el conteo con el fin de conocer la densidad y estandarizar las raciones del día de la misma manera que con los rotíferos. Como durante la primera semana se requiere mantener el menor tamaño de partícula para alimentar a los caballitos, se trataba de mantener la artemia en la primera fase de nauplio, lo cual se lograba disminuyendo su metabolismo al bajar la temperatura colocando botellas con hielo en los tanques (Figura 6).



Figura 6. Procedimiento para la cosecha de *Artemia franciscana*.

#### 6.4.2.2 Protocolo de enriquecimiento del alimento vivo

En el proceso de enriquecimiento, los rotíferos eran alimentados a un factor alimenticio de  $0,3 \text{ g} * 10^6$  rotíferos, mientras que las artemias se alimentaron a razón de  $0,6 \text{ g} * 10^6$  artemias. La dieta para ambos cultivos constaba de 30% de alimento para peces Sera marin GVG-mix®, 20% de emulsión de Scott® y 50% de Protein Selco Plus®. Una vez conocida la densidad de cada cultivo y el factor alimenticio se realizaron los siguientes cálculos usados por Ospina-Salazar *et al.*, (2011):

$$\text{Total de alimento (g)} = \text{Total rotífero} = \text{Total artemias} * 10^6 * \text{Factor alimenticio}$$

A partir del total de alimento, se calcula la proporción de cada ingrediente:

$$\text{Ingrediente X (g)} = \text{Total de alimento (g)} * \% \text{ inserción en la dieta del ingrediente X}$$

Cada ingrediente se pesó en la balanza de 0.0001 g de precisión, y se mezclaron en una licuadora con 500 mL de agua de mar, durante cuatro minutos. Para los rotíferos el enriquecedor se suministraba dos veces al día, todos los días para mantener los cultivos en enriquecimiento prolongado. Para las artemias, el enriquecimiento era a corto plazo (14 h) y se realizaba después de 48 h de su eclosión, que es cuando empiezan a alimentarse, la dieta se suministraba en una sola ración en la noche para al día siguiente alimentar con ella a los caballitos.

### 6.4.3 Mantenimiento y limpieza de los sistemas

#### 6.4.3.1 Monitoreo de la calidad de agua

Las variables fisicoquímicos se midieron diariamente a las 9:00 am en una incubadora seleccionada al azar. Todo el sistema estaba conectado a la circulación del laboratorio, donde las variables son controladas y ajustadas a los rangos óptimos para el cultivo de caballitos de mar (Tabla 4).

Tabla 4. Parámetros fisicoquímicos recomendados para el cultivo de *H. reidi* (Ospina-Salazar *et al.*, 2011).

PARÁMETRO	RANGO ÓPTIMO
Salinidad	32 – 35
Temperatura (°C)	25 – 27
pH	8,0 – 8,5
Oxígeno (mg.L <sup>-1</sup> ):	>5

#### 6.4.3.2 Limpieza de los sistemas

Los sistemas se limpiaron diariamente realizando sifoneo, para retirar los caballitos muertos, evitar la acumulación de materia orgánica y proliferación de anemonas, adicionalmente cada cuatro días se cambiaban los filtros.

#### 6.4.4 Muestreos

Se tomaron 10 caballitos del lote de recién nacidos para conocer el peso promedio inicial de las crías al nacer, los animales fueron tomados al azar, sacrificados con un exceso de benzocaina y cada animal fue secado y pesado en una balanza analítica de 0.0001 g de precisión. A los ocho días se pesaron todos los caballitos de cada una de las incubadoras, anestesiando a los animales (Figura 7).

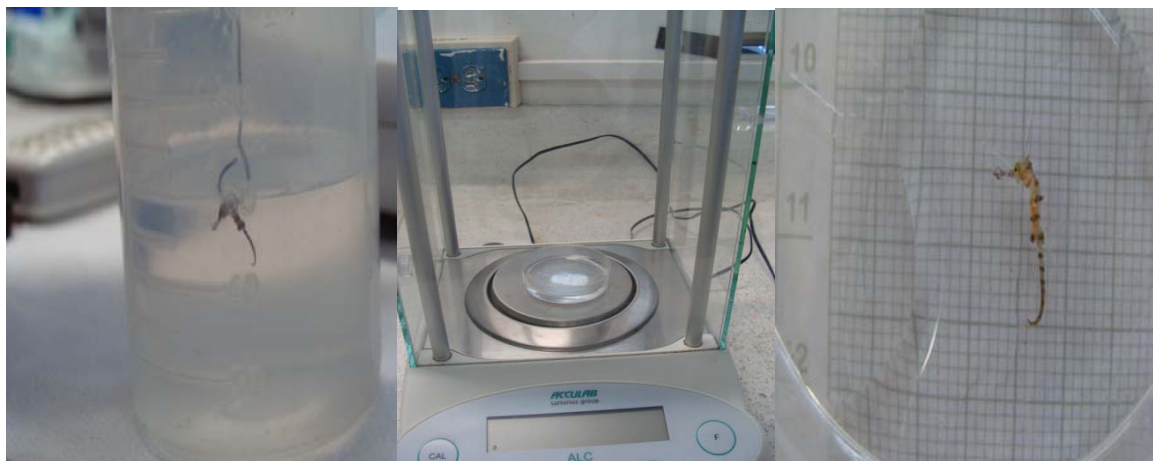


Figura 7. Aplicación de anestesia durante el muestreo de crías de *H. reidi*.

Con los datos obtenidos se realizaron los siguientes cálculos (Jobling, 1994; Silva y Anderson, 1995; Lin *et al.*, 2008;.):



### **Peso ganado (PG)**

Cálculo: 
$$PG(\%) = 100 * \left( \frac{\text{Peso final (mg)} - \text{Peso inicial (mg)}}{\text{Peso inicial (mg)}} \right)$$

### **Ganancia de peso individual (GPI)**

Cálculo: 
$$GPI(\text{mg/día}) = \left( \frac{\text{Peso final (mg)} - \text{Peso inicial (mg)}}{\# \text{ días}} \right)$$

### **Tasa específica de crecimiento**

Cálculo: 
$$TEC = 100 * \left( \frac{\text{Ln peso final (mg)} - \text{Ln peso inicial (mg)}}{\# \text{ días}} \right)$$

En la Figura 8 se ilustra el esquema de manejo para realizar los experimentos y se resumen los pasos necesarios para el mantenimiento y levante de crías de caballitos de mar durante el primer mes de vida.

#### **6.4.5 Análisis de los datos**

En los bioensayos de densidades se realizó una prueba no paramétrica de Kruskal Wallis, para comparar la supervivencia entre los tratamientos. Para el peso ganado (PG), la ganancia de peso individual (GPI) y la tasa específica de crecimiento (TEC), no se pudo realizar ninguna prueba estadística debido a que en dos de los tres tratamientos solo se tenían dos replicas; adicionalmente, al ser tan pocos los caballitos que sobrevivieron, las unidades muestrales fueron muy pequeñas para aplicar cualquier prueba estadística.

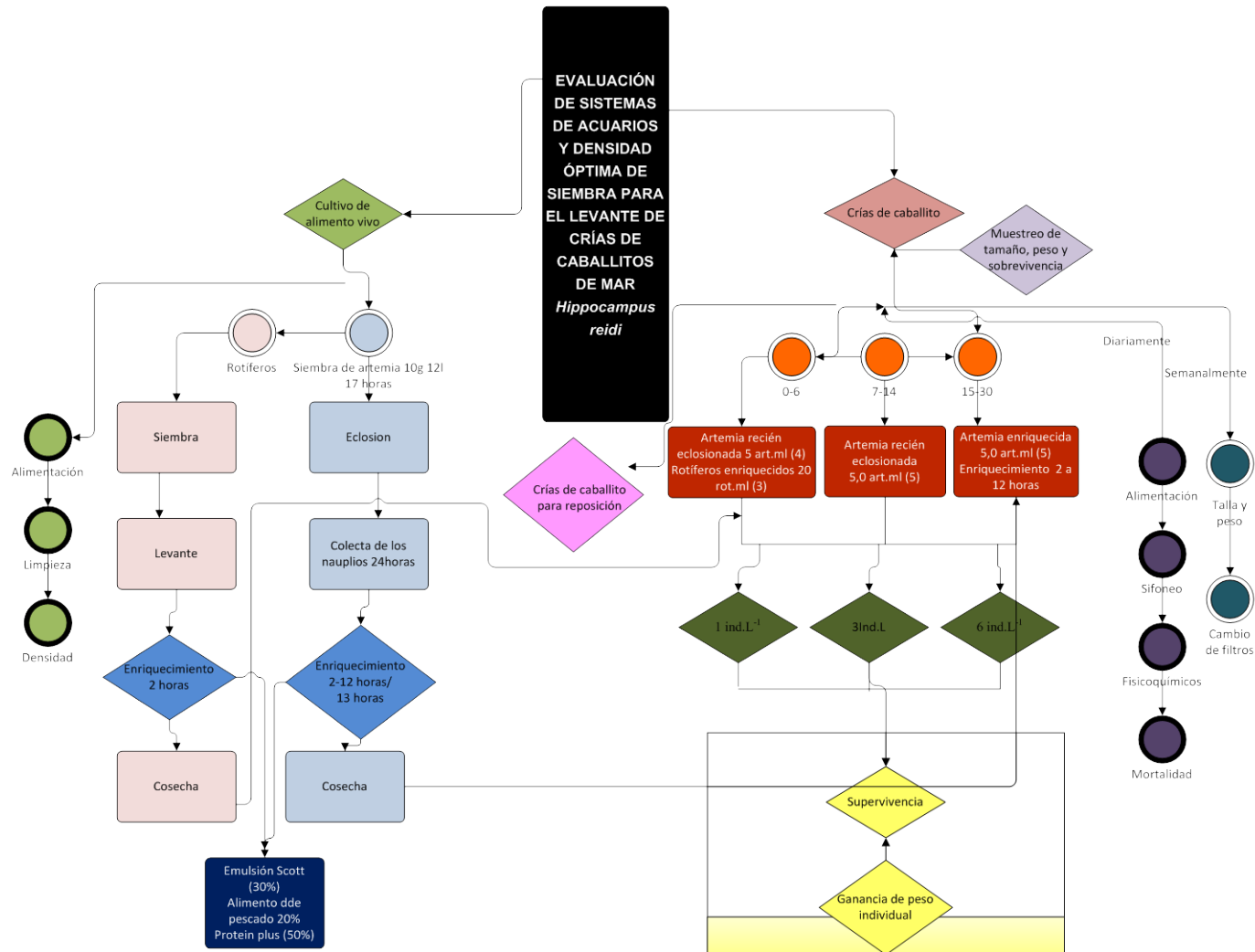


Figura 8. Esquema para el levante y mantenimiento en laboratorio de crías de *H. reidi* durante el primer mes de vida.

## **7 RESULTADOS**

### **7.1 ENSAYOS DE OBTENCIÓN, ALIMENTACIÓN Y MANEJO DE LAS CRÍAS**

#### **7.1.1 Manejo de reproductores**

Los reproductores de *H. reidi* mantenidos en cautividad, se adaptaron fácilmente a las condiciones de laboratorio, mostrando una preferencia por el consumo de misidáceos y artemias adultas. En cuanto al aspecto reproductivo el macho inicia el cortejo, aclarando la porción lateral del cuerpo que le muestra a la hembra, mientras busca asirse con su cola prensil y ensancha su bolsa de incubación exhibiéndose ante ella; una vez la hembra está lista, se posicionan para la cópula iniciando el ascenso en la columna de agua, la hembra le traslada al macho los óvulos, el macho después de la transferencia se balancea para acomodarlos en su bolsa de incubación, 14 días después se da el nacimiento de las crías.

#### **7.1.2 Ensayo de alimentación durante la primera semana**

Durante la primera semana de vida las crías de *H. reidi* alimentadas con la mezcla de rotíferos y artemias, presentaron una mayor supervivencia (89%) con respecto a las alimentadas únicamente con artemias con tan solo el 43% (Figura 9).

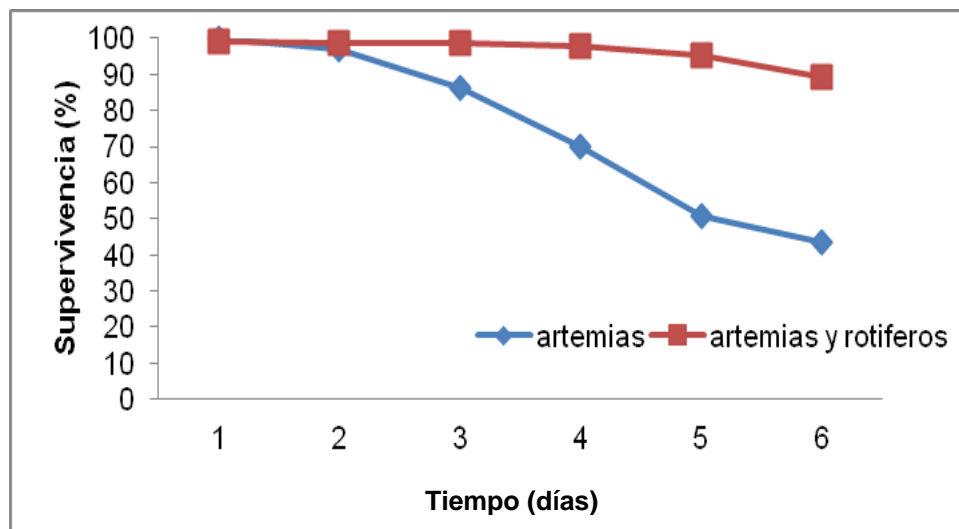


Figura 9. Supervivencia de crías de *H. reidi* alimentadas con dos dietas la primera semana de vida.

### 7.1.3 Aplicación de anestesia

Los ensayos sobre la eficiencia de dos concentraciones de benzocaina para el muestreo de las crías indican que con las concentraciones evaluadas (0,3 y 0,2 mg.L<sup>-1</sup>) es posible realizar el proceso de mediciones en caballitos a partir de una semana de edad, sin afectar la supervivencia de las crías; observando que a mayor peso el tiempo de reacción de los animales es mucho más rápido que en animales con menor peso y que muchos de estos tiempos de reacción también están sujetos a la tolerancia de cada cría. En la Figura 10 se describe el protocolo para sedar y muestrear los caballitos.

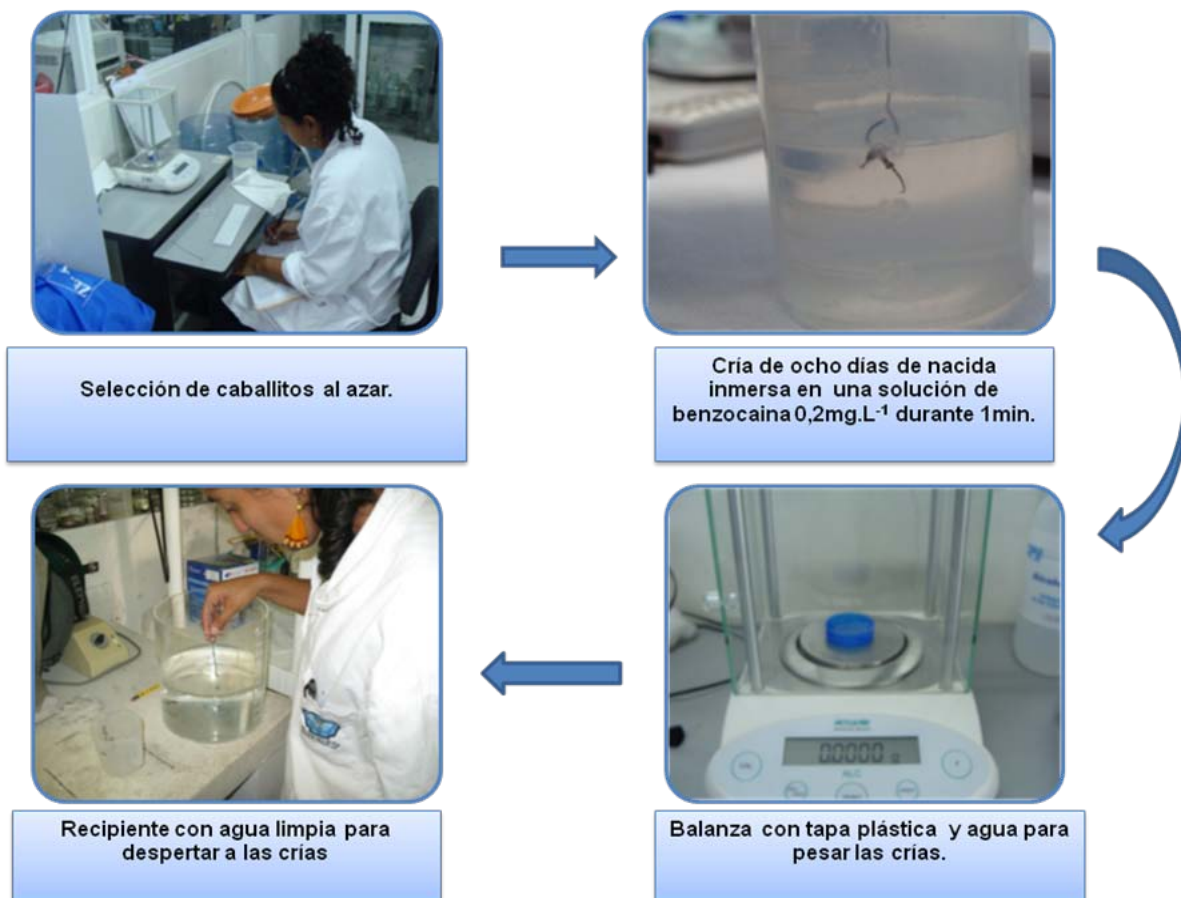


Figura 10. Protocolo de anestesia y mediciones en crías de una semana de edad de *H. reidi*.

Aunque parece ser que a una menor concentración se obtiene una reacción más rápida de las crías al momento de despertarse, también hay una relación con el peso de los caballitos y la concentración empleada, ya que los animales utilizados para la concentración más alta ( $0,3\text{ mg.L}^{-1}$ ), fueron menos pesados que los usados para la más baja ( $0,2\text{ mg.L}^{-1}$ ) y el tiempo que el caballito se tome para despertar, también depende de su tamaño. Como resultado se obtiene que dependiendo del peso de la cría y del tiempo estimado para realizar la biometría se debe usar una menor o mayor concentración de anestésico, como se observa en la Tabla 5.

Tabla 5. Concentraciones de anestesia experimentales para crías de *H. reidi* de una semana de vida. El tiempo de inmersión de las crías en el anestésico fue de un minuto.

NO. DE CRIAS	CONCENTRACIÓN DE BENZOCAÍNA (mg.L <sup>-1</sup> )	PESO (mg)	TIEMPO PARA DESPERTAR
1	0,3	3,9	4'37"
2		3,6	3'27"
3		7,3	2'21"
4		4,2	4'45"
5		3,2	4'39"
1	0,2	6,7	1'
2		5,5	2'26"
3		5,6	45"
4		7,3	41"
5		5,5	2'07"

## 7.2 DISEÑO DE INCUBADORAS PARA LEVANTE DE CRÍAS.

### 7.2.1 Sistema 1: Acuario de 25 L

Como primer sistema de levante para crías de *H. reidi* se utilizó un acuario de 25 L. Éste cuenta con un sistema tipo "air lift" construido con un tubo PVC (1½") con perforaciones en la parte inferior, adaptación de un codo (1½") en la parte superior y en su interior se introdujo una manguera plástica de 1/8" con una piedra difusora, con el cual se proporcionaba aeración y un leve movimiento en la superficie del agua, evitando que las crías llegaran hasta la superficie y captaran aire atmosférico. La entrada de agua se ubica en la parte superior, utilizando un tubo de ½" al cual se le conectaron cuatro mangueras plásticas de 1/8" distribuidas en el acuario de tal forma que el agua cayera en el centro del acuario; el desagüe consiste en un tubo de ½" que controla el nivel y sobre él se ubica un tubo de mayor diámetro y altura a manera de camisa, en el cual se realizan perforaciones que permiten la salida del agua pero retienen los organismos en el acuario (sistema de collar), además este sistema reduce la succión al distribuir esta fuerza en muchos puntos dentro de un tubo abierto (Figura 11).

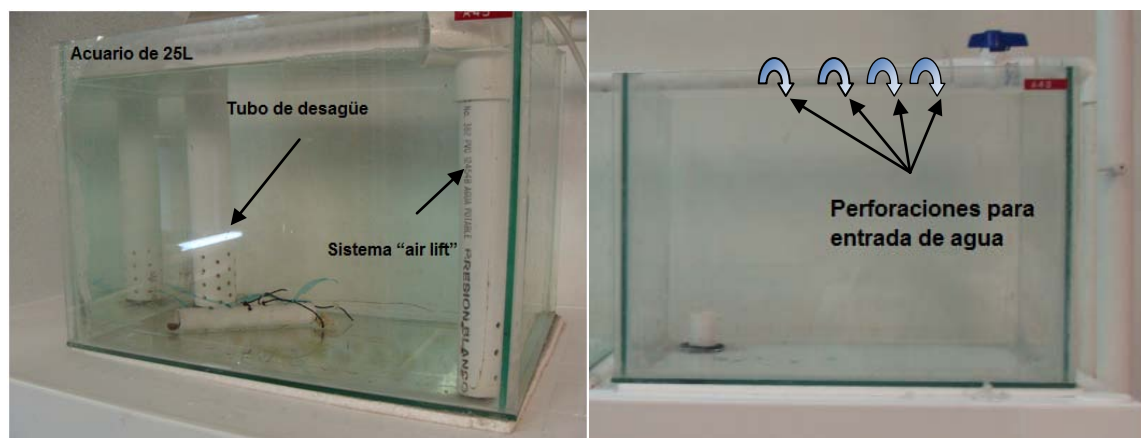


Figura 11. Sistema 1: Acuario de 25 L para levante de crías de *H. reidi*.

Con este sistema no se logró romper la tensión superficial en todo el acuario, ni se generaba una fuerza que hiciera que las crías bajaran, por lo que al tercer día, las crías se encontraban flotando en la superficie, afectadas por la enfermedad de la burbuja. Después del cuarto día, la supervivencia disminuye notablemente de un 76 a 100%, sobreviviendo los organismos sólo una semana, como resultado de estas observaciones se estableció que el sistema debería tener forma redondeada y no cuadrada.

### 7.2.2 Sistema 2: Baldes de 18 L

Para este sistema se utilizó como base una canaleta de fibra de vidrio que se llenó con agua hasta la mitad, para luego instalar dentro de ella tres baldes de 18 L. Este sistema debería reducir la interface agua aire al tener el desagüe por la parte superior (por rebose), la malla de 500  $\mu\text{m}$  ubicada en la parte superior del balde y puesta por debajo del nivel retendría las crías e impediría que flotaran.

La entrada de agua se realizó utilizando cuatro mangueras plásticas de 1/8" conectadas a una tubería principal de agua que dejaban caer pequeños chorros sobre la superficie del tanque pasando por el tamiz, con el fin de romper la tensión

superficial y realizar el recambio de agua en el sistema. El agua que rebosaba de los baldes caía en la canaleta, con lo cual se esperaba eliminar la fuerza de succión en los tanques (Figura 12).

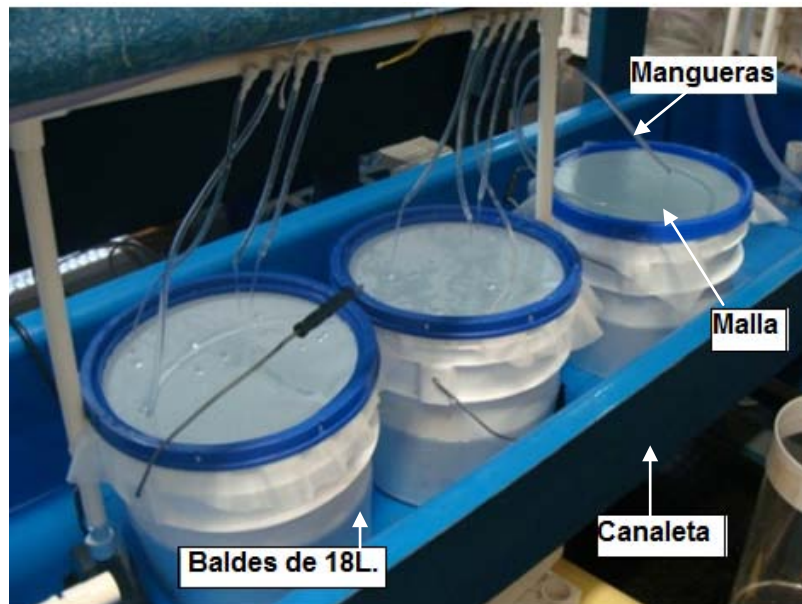


Figura 12. Sistema 2: Balde de 18 L con recubrimiento de malla en la parte superior.

Con este sistema la mayoría de las crías se encontraban pegadas al tamiz de retención desde el primer día, probablemente por la fuerza de salida del agua. Entre el primer al segundo día solo el 13% de la población sobrevivió y al cuarto día la mortalidad fue del 100%, presentándose un aumento en el tamaño de la vejiga natatoria consistente con la descripción de la enfermedad de la burbuja (Figura 13).



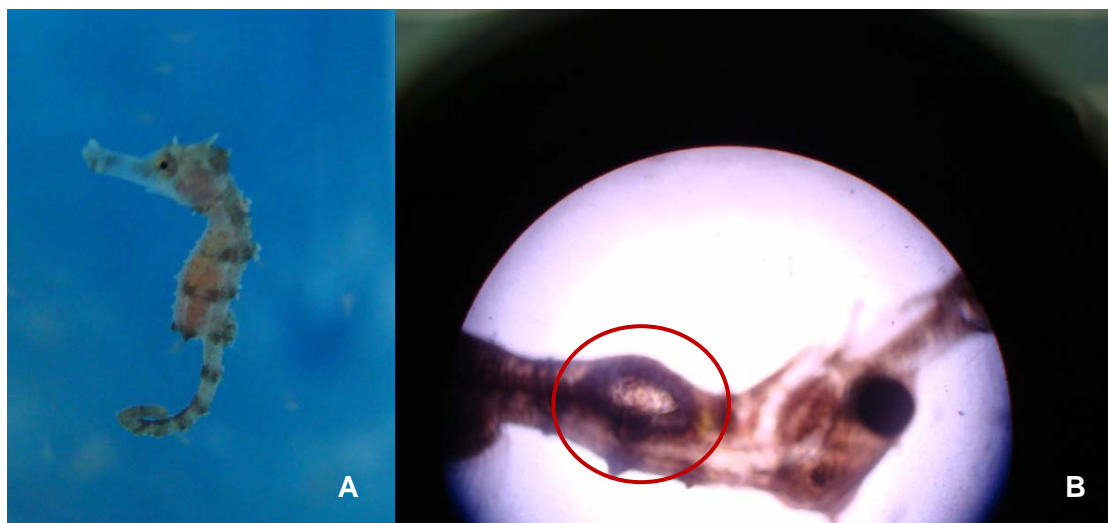


Figura 13. Crías de *H. reidi* sin enfermedad de la burbuja (A), y con enfermedad de la burbuja (B).

### 7.2.3 Sistema 3. Recipientes plásticos de 2 y 3,5 L

Para este ensayo se evaluaron tres tipos de sistemas de incubadoras retomando la idea de recipientes sin ángulos rectos que permitieran el movimiento circular del agua: 1) Sistema 3a: Botella plástica de 2 L dentro de tanque de acrílico, 2) Sistema 3b: Frasco redondo de 3,5 L y 3) Sistema 3c: Frasco cilíndrico con tapa de 3,5 L.

El sistema 3a consistió en colocar una botella plástica de 2 L dentro de un tanque de acrílico de 10 L y estos a su vez dentro de un acuario de 25 L. La entrada de agua se realizó por medio de dos mangueras plásticas de 1/8" que entraban por la parte superior de la botella, con el fin de romper la tensión superficial, se situó en la parte de abajo del tanque de acrílico un accesorio en PVC, ubicando encima la botella plástica, para darle la altura necesaria a la columna de agua. El desagüe consistió en una perforación de 10 cm en la parte inferior de la botella recubierta con un tamiz de 500  $\mu$ m. El agua que salía de la botella pasaba al recipiente de

acrílico que por rebosamiento permitía la salida del agua hasta el acuario y de allí a la circulación del laboratorio (Figura 14).

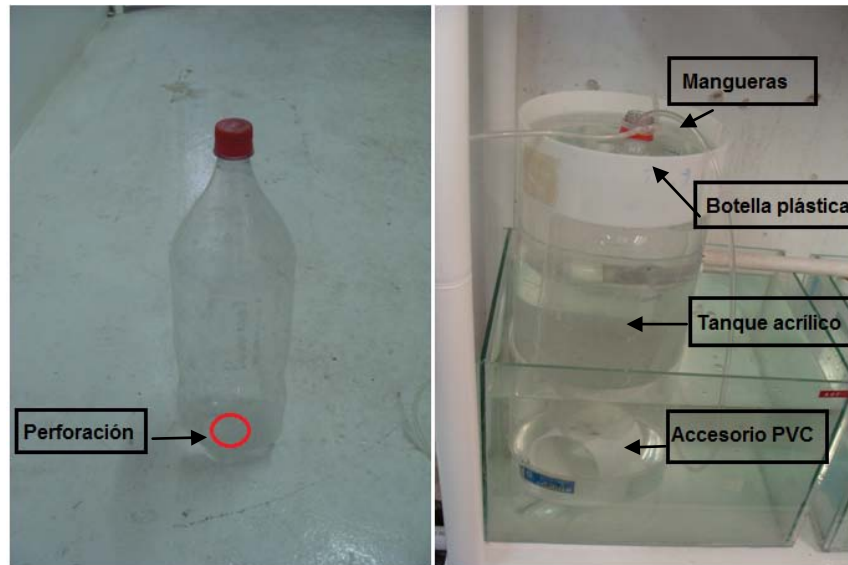


Figura 14. Sistema 3a. Incubadoras plásticas 3,5 L para mantener crías de *H. reidi*.

Para elaborar el sistema 3b se tomó un recipiente plástico cilíndrico y se introdujo de forma vertical dentro de un acuario de 25 L. A este recipiente se le realizaron tres perforaciones circulares; una en la parte superior, otra en la parte derecha y la tercera en la parte frontal. La entrada de agua se realizó por la perforación superior en la que se instaló un tubo de PVC de  $\frac{1}{2}$ ", por el cual se introdujeron dos manguera plásticas de  $\frac{1}{8}$ ". En la perforación de la parte derecha se conectó una manguera que también proporcionaba agua y la perforación frontal de 10 cm se cubrió con un tamiz de 500  $\mu\text{m}$ , para permitir la salida del agua (Figura 15). El recipiente para el sistema 3c se acondicionó de la misma forma que el anterior, con la entrada de agua por la parte superior a través de un tubo de PVC y por una abertura lateral y la salida del agua por la parte frontal (Figura 16).

La máxima supervivencia en estos sistemas se logró únicamente en el sistema 3c hasta el día cinco con 9,5%, el 100% de mortalidad ocurrió al tercer día para el

sistema 3b, al cuarto para el 3a y al sexto para 3c. La mayoría de mortalidades se dio por atrapamiento en el sistema de salida de agua y flotabilidad por la absorción de aire, además no se observaron nauplios de artemia en la mayoría de los tractos digestivos de las crías.

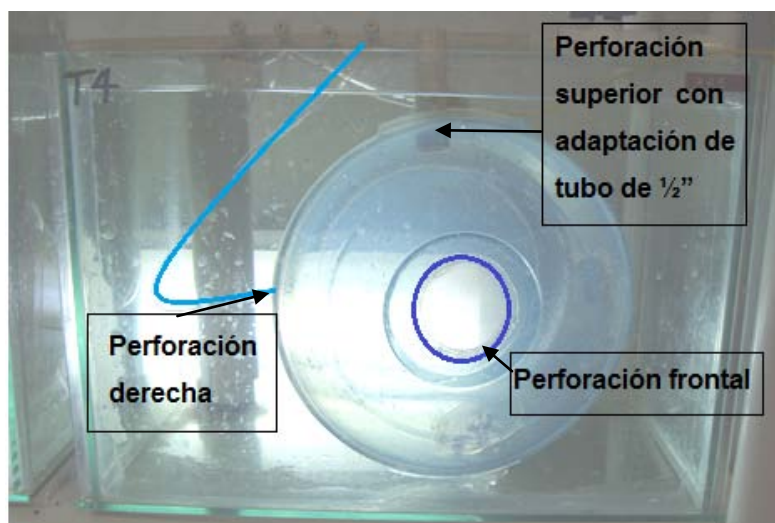


Figura 15. Sistema 3b. Recipiente de plástico cilíndrico de 3,5 L.

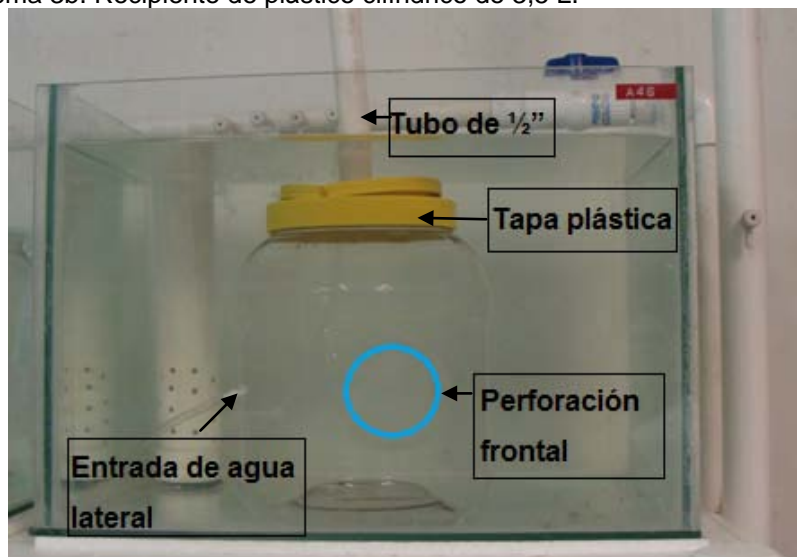


Figura 16. Sistema 3c: recipiente cilíndrico de 3,5 L con tapa.

#### 7.2.4 Sistema 4: Incubadora de 3,5 L

El recipiente plástico cilíndrico transparente de 3,5 L se ensayó colocándolo sin tapa, dentro del acuario de 25 L, realizándole la misma adecuación que el sistemas anterior. La diferencia entre este sistema y el anterior consistió en dejar el sistema abierto y que la entrada de agua se realizara por varias mangueras ubicadas en la parte superior para romper la tensión superficial, la entrada de agua por la parte lateral fue reemplazada por aeración, adicionalmente se disminuyó el tamaño de poro del tamiz del desagüe a  $300\mu\text{m}$  (Figura 17).

En este sistema, aunque la entrada de aire lateral generaba una corriente circular dentro del recipiente, las crías quedaban atrapadas en los puntos donde no había corriente, además las entrada de agua no lograban romper la tensión superficial ocasionando la muerte en un 100% de las crías por enfermedad de la burbuja.

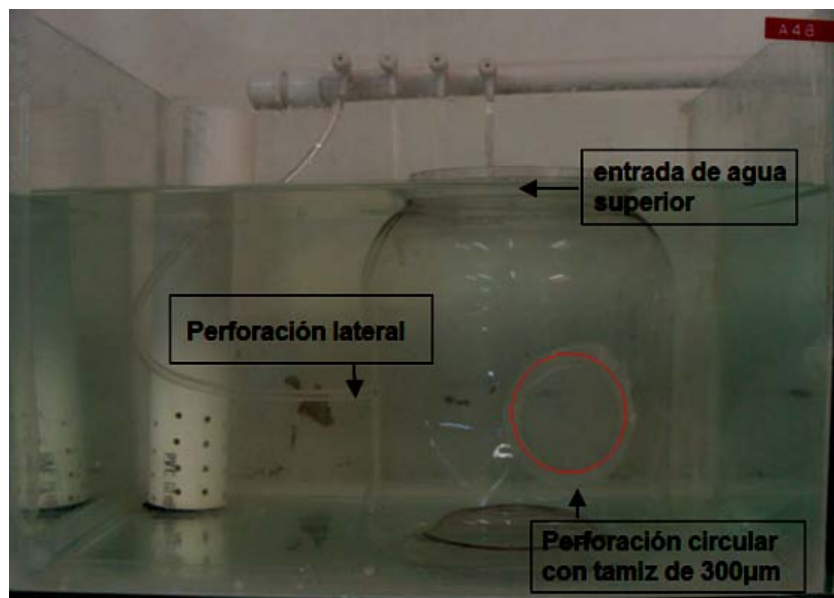


Figura 17. Sistema 4: Incubadora de 3,5 L para el levante de crías de *H. reidi*.

Debido a que con los recipientes ensayados a pesar de involucrar las variables establecidas como claves para evitar que las crías tomaran aire (romper la tensión

superficial, tener una circulación interna y un recambio permanente), no mostraron resultados satisfactorios, se decidió ensayar otro tipo de sistemas.

#### 7.2.5 Sistema 5: Incubadora de 12 L

Este sistema se construyó usando como base un tanque plástico de agua de 20 L, el cual se corto en la parte superior y se le colocó una tapa de acrílico en el corte, quedando ajustado contra los vidrios del acuario de 25 L. Al tanque se le realizaron cinco entradas de agua en la parte superior izquierda y dos entradas de aire en la parte media derecha. Para la entrada de aire se utilizaron dos mangueras plásticas de 1/8" por donde se suministró aeración a la incubadora, con esto se creaba un movimiento circular del agua, permitiendo que las crías se mantuvieran en la columna de agua y evitando llegar hasta la superficie. La salida de agua se realizó por medio de la perforación que se hizo en la parte inferior-derecha y que se cubrió con un tamiz de 300 $\mu$ m (Figura 18).

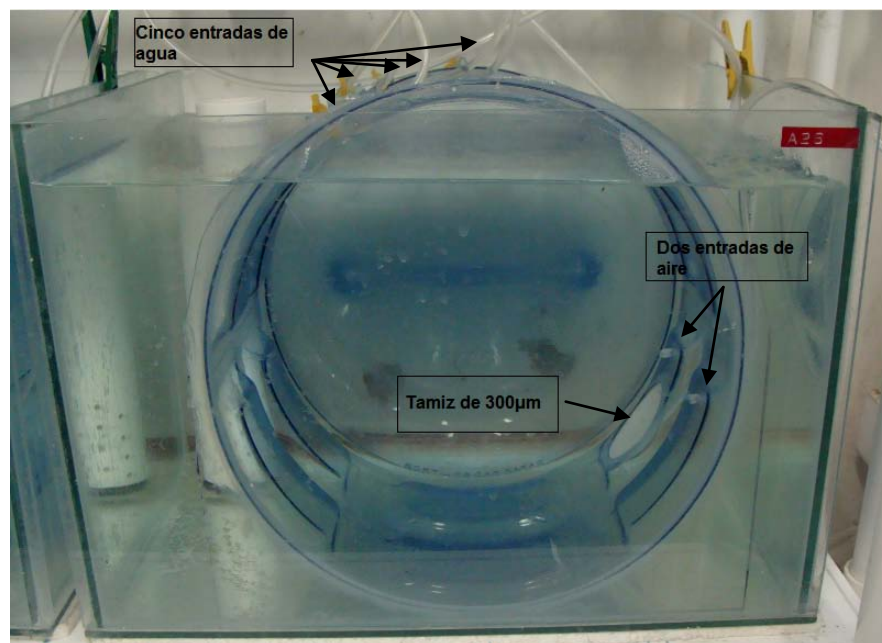


Figura 18. Sistema 5. Incubadora de 12 L. para levante de crías de *H. reidi*.

Por primera vez los caballitos logran sobrevivir más de una semana, alcanzando un supervivencia de 18,5% a los ocho días. Este sistema se utilizó con buenos resultados para el desarrollo de otras investigaciones en el LABBIP como los ensayos de dietas, salinidades y temperaturas, pero para el ensayo de densidades no permite variar el volumen de la incubadora con facilidad, para mantener constante la densidad de las crías, por lo que se debió diseñar otro sistema para poder desarrollar el experimento.

#### **7.2.6 Sistema 6: Incubadora de 16 L con filtro de cascajo**

Con el fin de manejar con facilidad el volumen en la incubadora, para ofrecer a las crías la densidad de alimento adecuada y facilitar el manejo y mantenimiento de los organismos, se construyó un sistema con botellones transparentes de 20 L, cortados en la parte superior y marcada volumétricamente hasta los 16 L. La entrada de agua se diseñó de tal manera que la caída en forma de pequeñas gotas sobre toda la superficie rompiera la tensión superficial, lo cual se logró incorporando un recipiente plástico con perforaciones en el fondo a manera de regadera. El sistema de desagüe consta de dos partes principales una externa y una interna, la interna estaba conformada por un tubo de PVC de ½" de aproximadamente 15 cm de largo, con perforaciones, el cual se conecta con accesorios de PVC, a la parte externa constituida por un tubo de 40 cm de largo ubicado de forma paralela al botellón de tal manera que regula la salida de agua y al mismo tiempo mantiene el nivel de agua deseado dentro del recipiente. Para este ensayo se utilizó un fondo de cascajo de 15 cm que cubría el sistema de salida del agua (Figura 19).



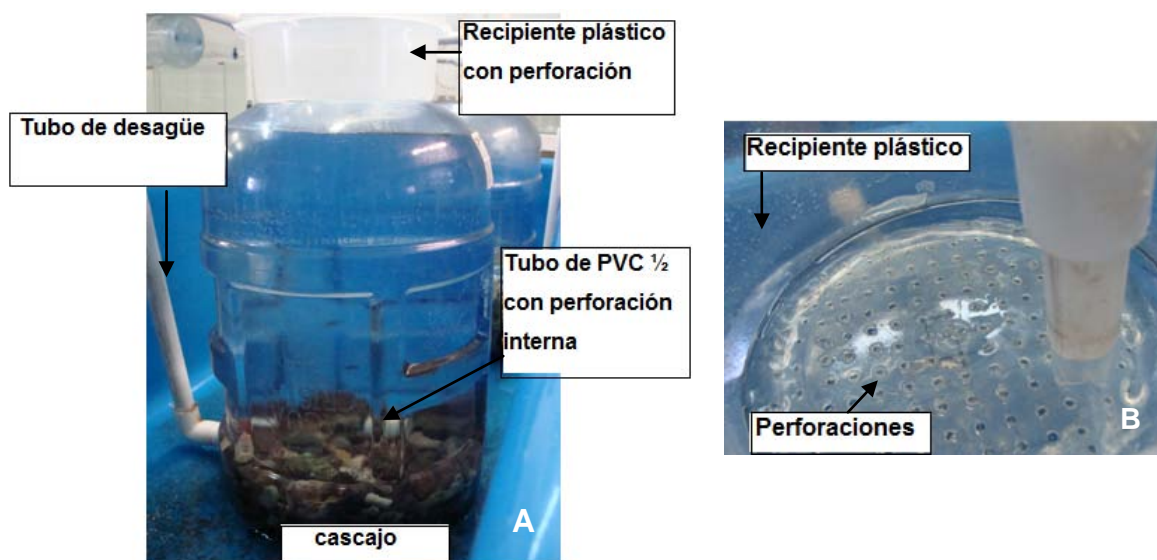


Figura 19. Sistema 6: Incubadora de 16 L para el levante de crías de *H. reidi* con filtro de cascajo (A), detalle del recipiente plástico para la entrada de agua (B).

El sistema funcionó mejor que en las pruebas anteriores, sin embargo el fondo de cascajo dificultó estimar las mortalidades diarias, ya que las crías muertas no se podían ver claramente en el fondo del tanque, dificultando el mantenimiento y la limpieza del fondo donde se acumulaba sedimento y detritos, que con el tiempo colmataba el filtro de salida haciendo que se rebosara el tanque y ocasionando pérdida de crías. Por otra parte, aunque la entrada permitió romper la tensión superficial del agua, se seguía presentando algunos puntos muertos (donde no caían las gotas de agua) en la superficie, quedando atrapados los caballitos y muriendo en un 100% las crías por la formación de burbujas.

#### 7.2.7 Sistema 7: Incubadora de 16 L con filtro de desagüe en PVC

Se utilizó el mismo diseño de incubadora anterior, modificando el sistema de desagüe, para lo cual se utilizó un tubo de PVC de 1/2" con un tapón liso en un extremo y en el otro extremo se conectaba al desagüe externo. Al tubo se le realizaron una serie de perforaciones pequeñas y se recubrió con un tamiz de 150

$\mu\text{m}$ , el cual puede permitir el paso del agua y al mismo tiempo retener las crías en el sistema (Figura 20).

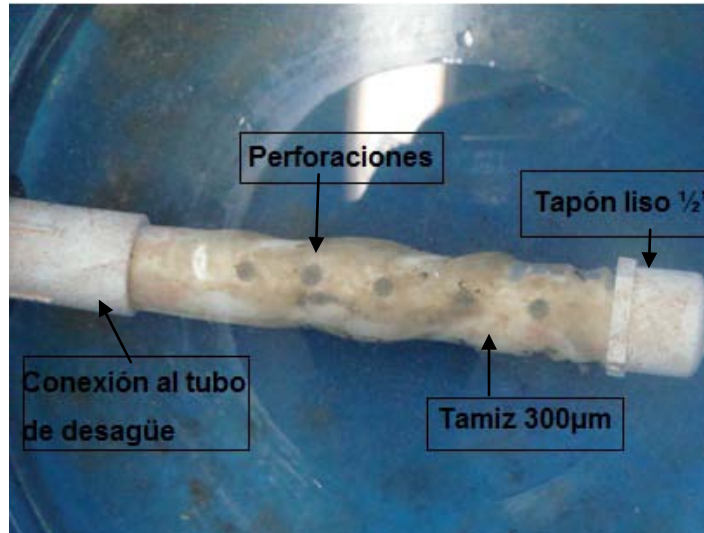


Figura 20. Sistema 7. Desagüe, con tamiz de 150  $\mu\text{m}$ , para el levante de crías de *H. reidi*.

Al utilizar este sistema de filtro las crías murieron en su totalidad a la semana, quedando la gran mayoría pegadas al tamiz que recubría el tubo, con este sistema de filtro se generaba una fuerza de succión que no lograban contrarrestar las crías. Para disminuir la fuerza se trató de disminuir el flujo de entrada de agua, pero al hacerlo, el agua solo se distribuía por unos pocos puntos dentro del sistema de regadera, reduciendo el área donde la tensión superficial se rompía y dejando muchos más puntos muertos donde los caballitos morían por formación de burbuja. Adicionalmente, el tamaño de poro que cubría el tamiz se colmataba con demasiada rapidez, ocasionando también el rebose de la incubadora y una pérdida adicional de crías por esta causa.



### 7.2.8 Sistema 8: Incubadora de 16 L con desagüe de botella

Con el fin de reducir la fuerza de succión del desagüe se modificó el filtro de salida, con uno hecho a partir de una botella plástica de 250 mL, a la cual se le realizó un corte rectangular de 12 cm de largo x 5 cm de ancho y se recubrió con un tamiz de 500  $\mu$ m. Este filtro se encontraba conectado también al tubo de desagüe externo, de la misma manera que los sistemas anteriores (Figura 21).

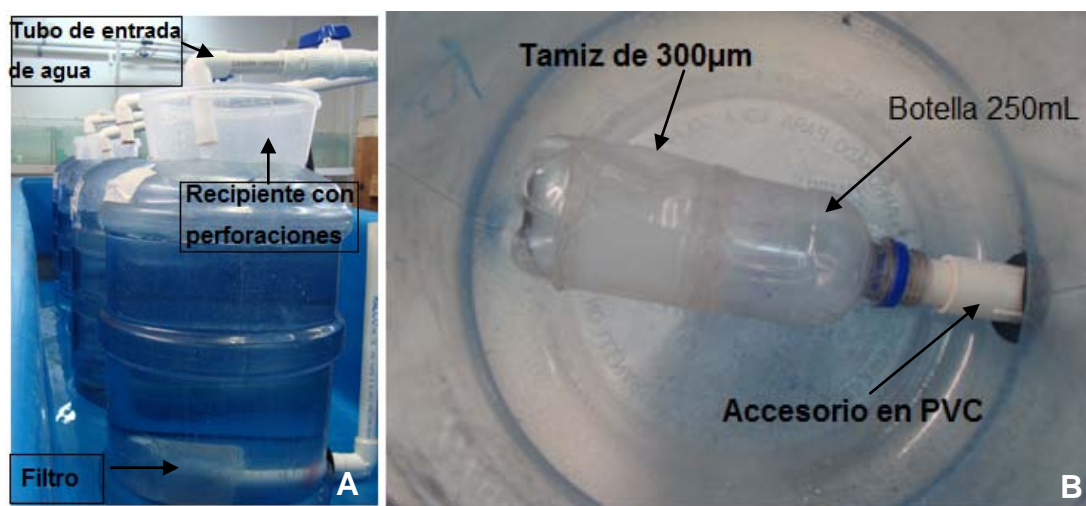


Figura 21. Sistema 8: Incubadora con desagüe de botella de 250 mL (A), detalle del filtro (B).

El filtro de botella redujo la succión, pero a partir del segundo día se iniciaron las mortalidades, logrando mantenerse el lote únicamente hasta el cuarto día con 13,6% de supervivencia, al día siguiente todas las crías murieron. Adicionalmente, el alimento no permanecía dentro de la incubadora más de cinco minutos por que el flujo era muy fuerte y el poro del tamiz demasiado grande, lo que no le daba tiempo suficiente a los caballitos para cazar su presa, requiriendo además alimentarlos con mayor frecuencia e incrementando los costos de mantenimiento.

### 7.2.9 Sistema 9: Incubadora de 16 L con entrada de agua a través de platos cóncavos

Dado que aún se observaban crías de caballitos de mar con burbujas, se decidió mejorar el diseño de la entrada de agua ampliando el corte de la parte superior de los botellones y ubicando un recipiente cóncavo con perforaciones en el fondo. Con esta ampliación en la parte superior se buscó abarcar la totalidad de la superficie evitando espacios muertos donde las crías pudieran quedar atrapadas y murieran por formación de burbujas de aire (Figura 22).

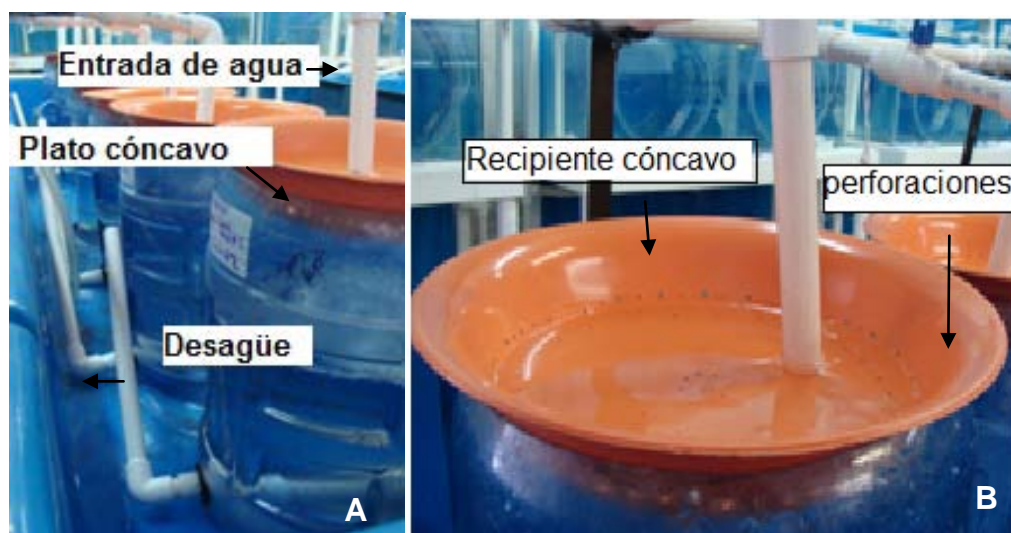


Figura 22. Sistema 9: Incubadoras de 16L para levante de crías de *H. reidi*, con entrada de agua a través de platos cóncavos (A), detalle del plato (B).

El uso de este tipo de recipiente en la parte superior de la incubadora, sumado a la ampliación del corte superior, requería un mayor flujo para que se produjo el goteo por toda la superficie, sin embargo se observaba que en algunos puntos los orificios no goteaban aún cuando se utilizó un flujo abundante; debido a esto, se presentaban espacios muertos, provocando que las crías empezaran a flotar. Al presentarse este problema se hicieron los huecos más espaciados y de menor tamaño, utilizando un flujo mínimo de agua.

Este sistema fue muy difícil de manejar debido a la forma del plato, que hacía que los orificios tuvieran que ser distribuidos de diferente manera en la medida en que se alejaba del centro y variar los tamaños; como este procedimiento se realizaba manualmente no era muy preciso y todos los platos no presentaban la misma distribución ni diámetro de huecos, además el plato no quedaba ubicado siempre en el mismo lugar, podía desestabilizarse en la manipulación diaria inclinándose hacia algún punto y variando la entrada de agua, por ende se continuaron presentando problemas de flotabilidad por burbuja en las crías y en algunos casos el rebosamiento en el recipiente distribuidor de agua por el aumento en el flujo de entrada, ocasionando la mortalidad total del lote hacia el cuarto día.

#### **7.2.10 Sistema 10: Incubadora de 16 L con filtro de desagüe implementando botella plástica y aeración**

Se utilizó el sistema de botellón de 16 L, pero se modificó el sistema de desagüe de la botella plástica, para lo cual se utilizaron dos mangueras plásticas de 1/8" que se introducían a través del tubo externo; una de las mangueras tenía en su extremo una piedra difusora plana, para producir burbujas pequeñas dentro de la botella justo bajo el recubrimiento de tamiz, la otra manguera no tenía piedra difusora y se colocaba para eliminar el vacío que se formaba dentro de la botella, lo cual contrarrestaba la fuerza de salida del aire a través de la piedra difusora, perdiendo el efecto que esta generaba y contrarrestando la succión (Figura 23).



Figura 23. Sistemas 10: Desagüe con botella plástica de 250 mL y mangueras de aeración.

Con las mejoras disminuyó el número de crías muertas por succión, pero el sistema se desestabilizaba fácilmente ya fuera porque la posición de la piedras, las mangueras o la aeración cambiaba un poco durante las actividades de limpieza y mantenimiento que nuevamente originaban la succión. En este punto de los ensayos, se presentaban más mortalidades por succión que por burbuja.

#### **7.2.11 Sistema 11: Incubadora de 16 L con entrada de agua en forma de regadera en PVC**

Una vez comprobado que el sistema de regadera funcionaba para reducir la enfermedad de la burbuja en las crías, pero que los sistemas elaborados tenían puntos débiles que había que mejorar, se elaboró un nuevo diseño a partir de dos tubo de PVC de  $\frac{1}{2}$ ", de partes iguales unidos por medio de una "T" en PVC, quedando de un tamaño aproximado de 20 cm de largo, a cada tubo se le realizaron pequeños huecos y se colocó un tapón en cada extremo. Se utilizaron pitillos delgados, los cuales se cortaron a un tamaño de 3 cm y se colocaron en algunos de los huecos que no alcanzaban a llegar a los extremos del botellón,

para disminuir los espacios muertos en la superficie del botellón, una vez se tenía la regadera se conectaba al tubo de entrada de agua principal (Figura 24).

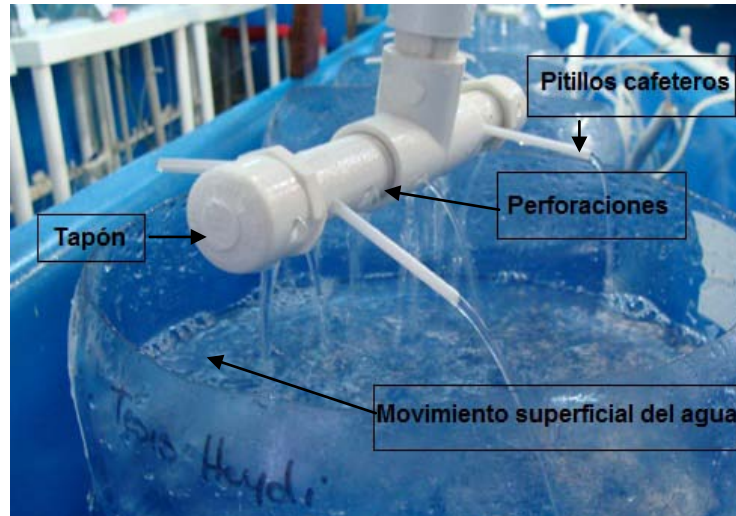


Figura 24. Sistema 11: Entrada de agua en forma de regadera, para el levante de crías de *H. reidi*.

El movimiento generado por este sistema, no permitía la formación de espacios muertos y al mismo tiempo evitaba que las crías alcanzaran la superficie por la fuerza generada en la superficie, manteniéndolas en la columna de agua, además el sistema no requería un flujo de entrada fuerte. Una vez resuelto el 50% del problema, al tener claro el sistema de entrada de agua, se enfocaron los esfuerzos en resolver los problemas del diseño del desagüe.

#### **7.2.12 Sistema 12: Incubadora de 16 L con filtro de esponja en el desagüe**

El sistema de desagüe de botella de 250 mL fue reemplazado por un montaje con esponja dura de 6 cm de grosor, esta esponja se corto en forma rectangular y se le realizo una perforación interna, para luego introducir un tubo de PVC de ½", de 15 cm de largo, de tal manera que la esponja lo recubriera. Al tubo se le hicieron

pequeñas perforaciones para la salida del agua. En un extremo del tubo se colocó un tapón liso y el otro extremo se conecto al tubo exterior (Figura 25).

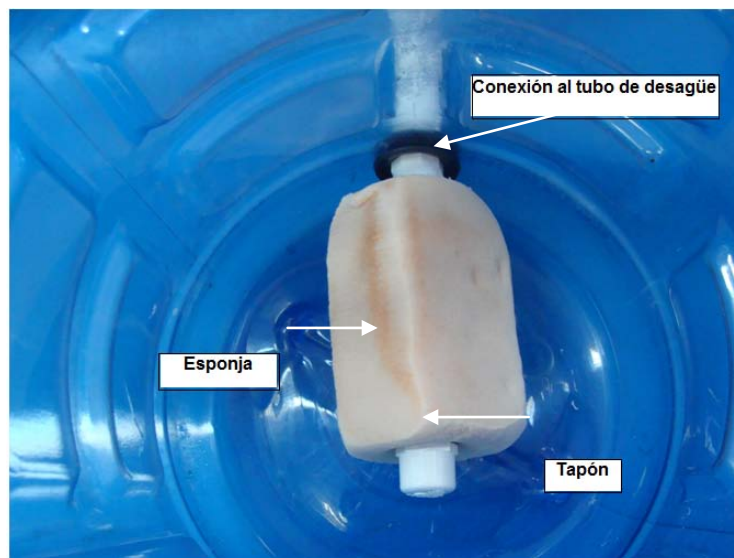


Figura 25. Sistema 12: Desagüe con adaptación de esponja para el levante de crías de *H. reidi*.

Al tener una entrada de agua mínima e implementar una esponja como filtro se logro disminuir casi en su totalidad la succión de las crías, pero al tercer día, se comenzó a observar gran cantidad de partículas suspendidas en la incubadora, que eran pequeños pedazos de esponja, que en algunos casos se confundían con la artemia recién eclosionada que se le proporcionaba a las crías. Al sexto día fue necesario hacer una limpieza total de la incubadora ya que el agua se notaba de color turbio, olor desagradable y acumulación de pedazos de esponja en el fondo.

#### 7.2.13 Sistema 13: Incubadora de 16 L con desagüe de esponja y tamiz

Para disminuir la presencia de partículas en suspensión producidas por la esponja, se recubrió con un tamiz de 150  $\mu\text{m}$ , pegado con silicona a los extremos del tubo. Con este sistema las crías se introducían entre el tamiz y la esponja quedando atrapadas; debido al tamaño de las crías es necesario que el recubrimiento quede perfectamente sellado para evitar este problema (Figura 26).



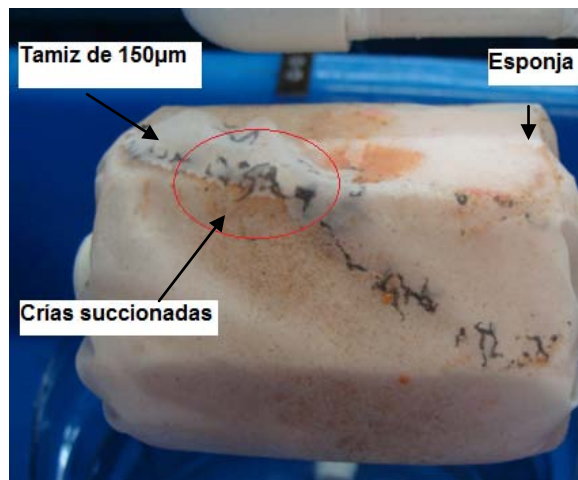


Figura 26. Sistema 13: Desagüe con filtro de esponja y recubrimiento de tamiz de 150 µm, para el levante de crías de *H. reidi*.

#### 7.2.14 Sistema 14: Incubadora de 16 L con desagüe de esponja y media velada

Para este ensayo del sistema de desagüe, la esponja fue recubierta con una media velada y amarrada al mismo tubo sin dejar ningún espacio, para evitar que las crías se introdujeran dentro de la media, solo un pedazo de tubo quedo descubierto para realizar la conexión al tubo de desagüe (Figura 27).

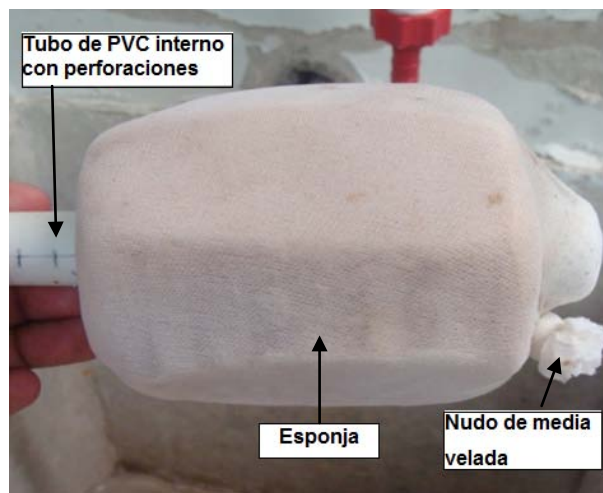


Figura 27. Sistema 14: Incubadora de 16 L con filtro de esponja y media velada.

Al implementar la media velada se observó que las crías podían permanecer muy cerca de la esponja sin ser succionadas, la cantidad de alimento que se les proporcionaba permanecía por mucho más tiempo dentro de la incubadora y no se presentaron partículas suspendidas de esponja en la columna de agua, logrando una supervivencia del 66% al octavo día.

En la figura 28 resumiendo lo descrito en los sistemas y corroborando la valoración de funcionamiento que se describe en la tabla 6, se puede observar como las incubadoras 2, 3a 3b y 9 solo lograron mantener las crías hasta el cuarto día con registro de mortalidad del 100%. Para los sistemas 1, 3c, 7 y 8 se logró mantener a las crías vivas sólo hasta el quinto y séptimo con 13% de supervivencia. Finalmente en los sistemas 5 y 14 los lotes sembrados lograron sobrevivir los ocho días que duró la prueba con porcentajes de supervivencia de 18 y 66% respectivamente por lo que se seleccionó el sistema 14 para desarrollar los experimento de densidades de siembra.



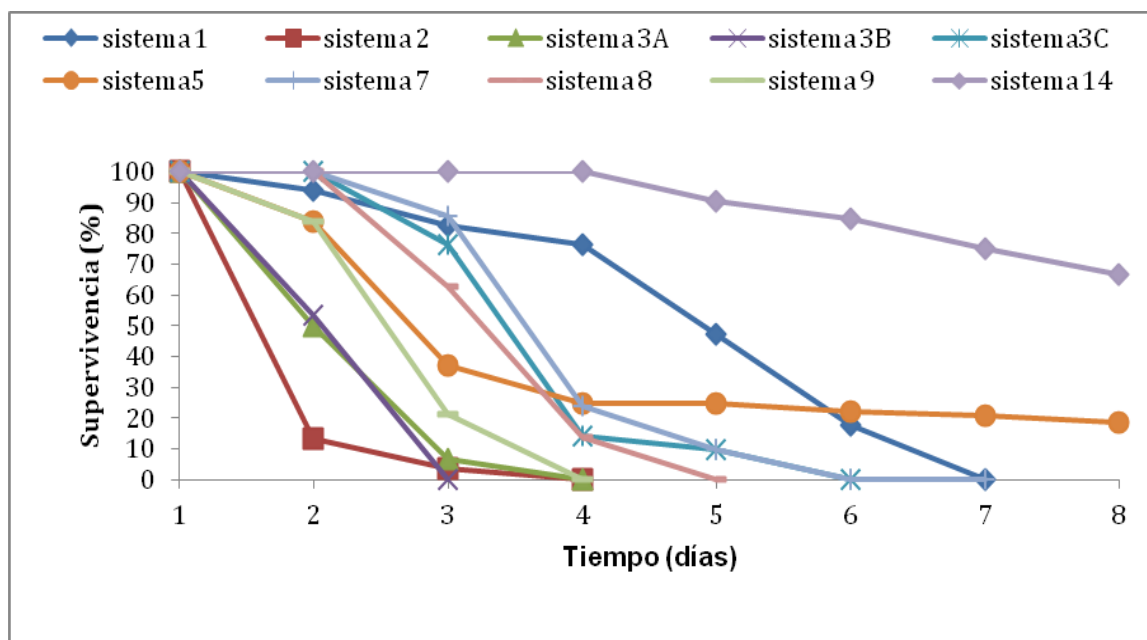








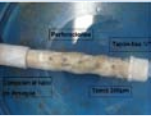



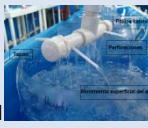


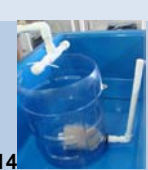


Figura 28. Supervivencia de crías de caballito de mar en las diferentes incubadoras.

En la Tabla 6 se hace una valoración resumida de cada una de las variaciones y sistemas fabricados.

Tabla 6. Evaluación de los sistemas de incubadoras implementados para el levante de crías de *H. reidi* de acuerdo con diferentes criterios cualitativos. El signo ✓ significa que si cumplió con el criterio, por el contrario una X denota que éste no se cumplió. Los recuadros rojos corresponden a los sistemas más eficientes.

SISTEMAS	Volumen (L)	Control de flotabilidad	Control de atrapamiento	Supervivencia de las crías	Facilidad de limpieza	Retención de alimento
1 	25	X	✓	X	✓	X
2 	18	X	X	X	X	X
3a 	10	X	✓	X	X	X
3b 	3,5	X	X	X	X	X
3c 	3,5	X	X	X	X	X
4 	3,5	X	X	X	X	X
5 	12	✓	✓	✓	✓	✓
6 	16	X	X	X	X	X
7 	16	X	X	X	X	X

SISTEMAS	Volumen (L)	Control de flotabilidad	Control de atrapamiento	Supervivencia de las crías	Facilidad de limpieza	Retención de alimento
8 	16	X	X	X	X	X
9 	16	X	X	X	X	X
10 	16	X	X	X	X	X
11 	16	✓	✓	X	X	X
12 	16	✓	X	X	X	X
13 	16	✓	X	X	X	X
14 	16	✓	✓	✓	✓	✓

### 7.3 SISTEMA DE LEVANTE DE CRÍAS PARA LOS BIOENSAYOS DE DENSIDAD

Para el desarrollo del experimento se elaboraron 12 incubadoras de 16 L, marcadas volumétricamente hasta los 14 L y puestas en dos canaletas de fibra de vidrio. Se colocó una línea secundaria de agua para alimentar los sistemas y conectar los dispositivos de entrada de agua. Para controlar el flujo de manera individual se colocó una llave de paso en la entrada al tubo regadera. El desagüe de las canaletas estaba conectado al sistema de circulación del LABBIP (Figura 29).

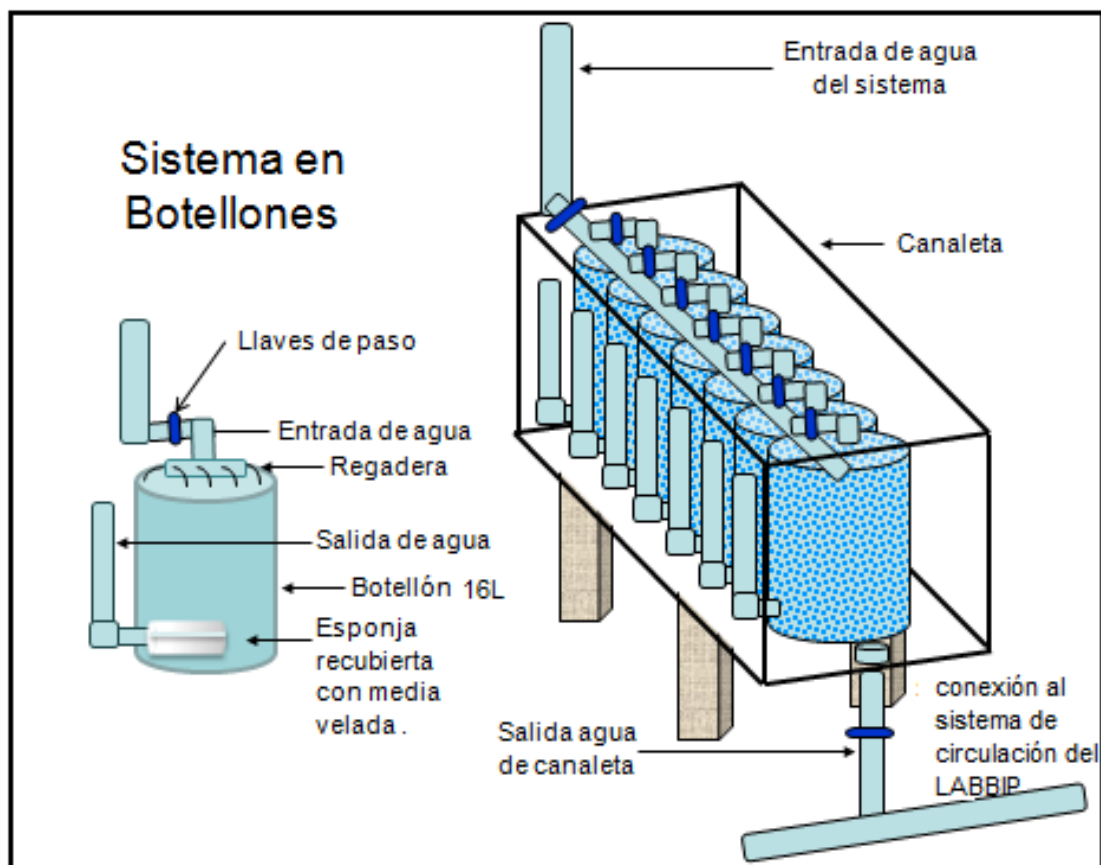


Figura 29. Sistema de incubadoras para el levante de crías de *H. reidi*.

## 7.4 BIOENSAYOS DE DENSIDAD

### 7.4.1 Monitoreo de la calidad de agua.

Durante los bioensayos las variables fisicoquímicas del agua se mantuvieron dentro de los rangos establecidos en el laboratorio como óptimos (Tabla 4). Los valores promedios fueron: temperatura  $26 \pm 0,55^{\circ}\text{C}$ , pH  $8,0 \pm 0,08$ , oxígeno  $6,7 \pm 0,73 \text{ mg.L}^{-1}$  y salinidad  $33 \pm 0,24$  (Figura 30).

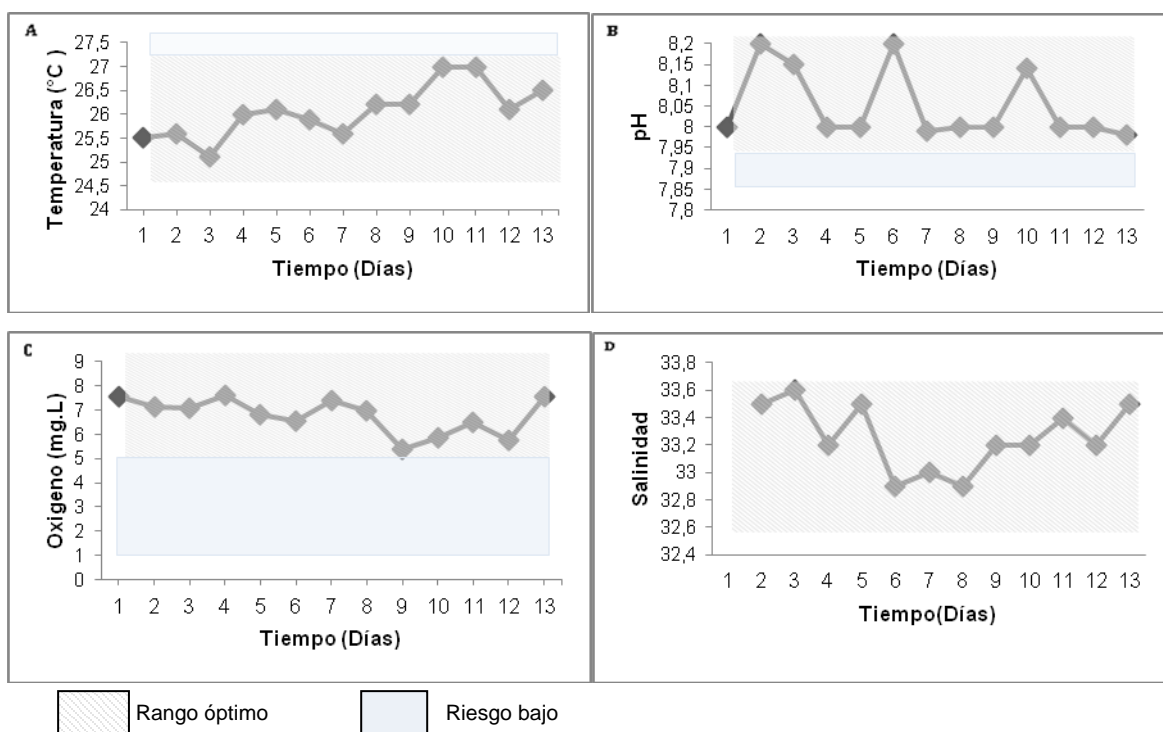


Figura 30. Comportamiento de la temperatura (A), oxígeno (B), pH (C) y salinidad (D) del agua durante los ensayos realizados.

### 7.4.2 Supervivencia

Figura 31 ilustra la supervivencia para los tres ensayos de densidad de siembra, el ensayo uno se trabajó con 1, 3 y 8 ind.L<sup>-1</sup> y los ensayo dos y tres con 1, 3 y 6 ind.L<sup>-1</sup>. Para las densidades de 1, 3 y 8 ind.L<sup>-1</sup> (Figura 31A), se muestra una marcada mortalidad en todos los tratamientos, sin embargo el tratamiento de 1 ind.L<sup>-1</sup> presentó una caída más drástica desde el primer día de muestreo, por el contrario los tratamientos en donde se tenían mayor número de individuos (densidades de 3 y 8 ind.L<sup>-1</sup>), presentaron supervivencia 30% en comparación al tratamiento de menor densidad, sin presentarse diferencias significativas entre los tratamientos ( $H_{cal} = 0,41 < H_{Tab(0,05,2)} = 5,99$ ). Debido a la alta mortalidad que se presentó durante este bioensayo y al mayor número de animales requeridos, se decidió utilizar una densidad más baja (1, 3 y 6 ind.L<sup>-1</sup>).

Para el ensayo dos (Figura 31B) a densidades de 1, 3 y 6 ind.L<sup>-1</sup> se observó que con 1 ind.L<sup>-1</sup> no se presentó mortalidad durante los primeros días de muestreo, mientras que la densidad de 3 y 6 ind.L<sup>-1</sup> registraron mortalidades del 96 y del 87%. Este ensayo solo se pudo evaluar hasta el noveno día, debido a que se presentaron problemas en el sistema de circulación de agua del laboratorio, ocasionando que los sistemas quedaran con volúmenes muy bajos de agua y las crías quedaran atrapadas en los filtros de salida. No se presentaron diferencias significativa entre los tratamientos ( $H_{cal} = 2,07 < H_{Tab(0,05,2)} = 5,99$ ).

En vista de que en el ensayo anterior se presentaron problemas de funcionamiento, se decidió realizar un tercer ensayo, utilizando las mismas densidades. En la Figura 31C, se muestra el comportamiento de la supervivencia del ensayo tres, donde se puede observar hasta el sexto día que el 80% de la población se mantenía en todos los tratamientos, sin embargo a partir del día siete la mortalidad se incrementa, especialmente en las densidades de 3 y 6 ind.L<sup>-1</sup>. A los 13 días en la densidad de 1 ind.L<sup>-1</sup>, se mantenía una supervivencia del 21,4%,

mientras que en los tratamientos de 3 y 6 ind.L<sup>-1</sup> ésta se encontraba en 6.3 y 11,1% respectivamente (Tabla 7), aunque la mortalidad fue menos marcada en este ensayo, las replicas de algunos tratamientos tenían tan poco animales que era imposible mantener las densidades en el volumen establecido, por esta razón se tuvo que suspender el ensayo. No se encontraron diferencia significativa entre los tratamientos ( $H_{cal}= 1,90 < H_{Tab(0,05,2)} = 5,99$ ).

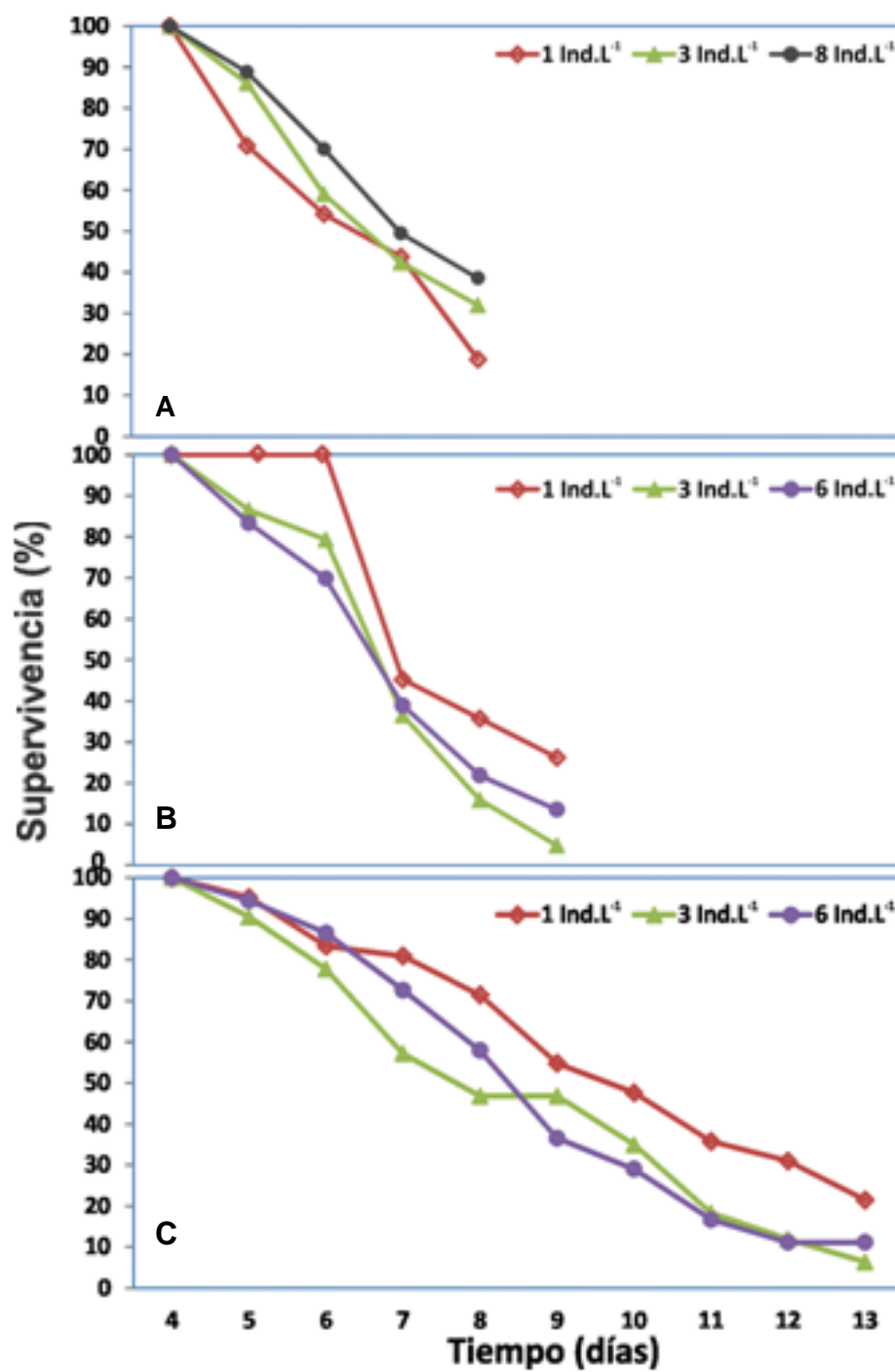


Figura 31. Supervivencia de las crías de *H. reidi*, para los tres ensayos de densidad. Ensayo uno: 1, 3 y 8 ind.L<sup>-1</sup> (A); ensayos dos y tres: 1, 3 y 6 ind.L<sup>-1</sup> (B y C).



Tabla 7. Parámetros de crecimiento y supervivencia en crías de *H. reidi* a diferentes densidades de siembra. Los valores se reportan como promedio de dos réplicas para las densidades de 1 y 3 ind.L<sup>-1</sup> ± D.E y promedio de tres replicas para la densidad de 6 ind.L<sup>-1</sup> ± D.E.

PARAMETRO	DENSIDADES		
	1 ind.L <sup>-1</sup>	3 ind.L <sup>-1</sup>	6 ind.L <sup>-1</sup>
Peso inicial (mg)	1,75±0,32	1,75±0,32	1,75±0,32
Peso final (mg)	3,82±0,53	4,17±0,53	4,64±0,23
PG (%)	117,8±22,2	137±30,2	164±13,6
GPI(mg/día)	0,25±0,04	0,30±0,06	0,36±0,02
TEC	1,28±0,12	1,30±0,17	1,43±0,07
Supervivencia (%)	21,4±18,8	6,3±4,95	11,0±11,3

Peso ganado (PG); Ganancia de peso individual (GPI) y Tasa específica de crecimiento (TEC)

### 7.4.3 Crecimiento

Se utilizó el ensayo tres para estimar la tasa de crecimiento en términos de peso en las crías de caballitos de mar, ya que fue el único que pudo prolongarse hasta los 13 días, permitiendo registrar las respuestas en crecimiento de las crías. La estimación de la tasa de crecimiento en este ensayo se realizó a los ocho días de iniciado el ensayo, donde sólo el tratamiento de 6 ind.L<sup>-1</sup>, conservaba sus tres replicas, mientras que los tratamientos de 1 y 2 ind.L<sup>-1</sup> sólo quedaban dos replicas.

Se observó que las crías cultivadas a una mayor densidad (6 ind.L<sup>-1</sup>), presentaron el mejor peso promedio, seguido por el tratamiento a 3 ind.L<sup>-1</sup> y finalmente el tratamiento de 1 ind.L<sup>-1</sup>. Las diferencias en peso con respecto al tratamiento de mayor crecimiento fueron de 0,47 mg para las crías cultivadas a 3 ind.L<sup>-1</sup>, mientras que las cultivadas a 1 ind.L<sup>-1</sup> presentaron una diferencia casi del doble (0,82 mg). En cuanto a las variaciones de peso (D.E.), también fueron menores en el

tratamiento de mayor densidad, mientras que en los de 1 y 3 ind.L<sup>-1</sup> fueron mayores de 0,5 mg (Tabla 7).

En cuanto al peso ganado (PG) se observó que los animales cultivados a una densidad de 6 ind.L<sup>-1</sup> crecieron 1.64 veces más su peso inicial, mientras que en 1 y 3 ind.L<sup>-1</sup> solamente crecieron entre 1,18 a 1,37 veces respectivamente. La ganancia de peso individual (GPI) registró que diariamente los animales crecieron entre 0,25-0,36 mg/día, partiendo de un peso inicial al nacer de 1,75 mg, el cual fue duplicado en todos los tratamientos a los ocho días de vida y casi triplicado en el tratamiento de 6 ind.L<sup>-1</sup>. La tasa específica de crecimiento (TEC) se mantuvo entre 1,28 y 1,43 (Tabla 7).

## 8 DISCUSIÓN

### 8.1 SISTEMAS PARA LEVANTE DE CRÍAS.

Algunas especies del género *Hippocampus*, entre ellas *H. reidi*, presentan una fase pelágica en las primeras semanas de vida (González *et al.*, 2004), esto hace que las condiciones de cultivo sean muy exigentes y se dificulte el trabajo experimental, durante la primera semana se registran las mayores tasas de mortalidad y las crías tienen una alta probabilidad de morir por captación de aire atmosférico, al quedar atrapadas en la superficie del agua, siendo necesario romper la tensión superficial para impedir su acenso. Aunque la enfermedad de la burbuja de aire es una de las principales causas de mortalidad en todos los estadios de vida de los caballitos de mar, generalmente cuando los sistemas no son efectivos, las crías son las más propensas a padecer de esta enfermedad (Woods, 2000). Chamorro y Planas (2008) trabajaron un diseño de acuarios para el mantenimiento y reproducción en cautividad del caballito de mar *H. guttulatus*, especie que a diferencia del *H. reidi* presenta un comportamiento bentónico desde el primer día de vida, lo cual hace menos vulnerable la especie a afecciones de este tipo.

De los sistemas diseñados la incubadora de 12 L (sistema 5), con adaptación de dos mangueras de aeración en la parte lateral derecha, producía un flujo circular que hacía que las crías se mantuvieran en la columna de agua, evitando que llegaran a la superficie y tomaran aire atmosférico, con este sistema se obtuvo una mayor supervivencia de las crías. Por el contrario el problema de los sistemas 7, 8, 10 y 13 produjeron altas mortalidades a causa de la succión de las crías generada en el filtro de salida.

Después de muchos ensayos realizados en laboratorio se logró diseñar una incubadora de 16 L con entrada de agua a manera de regadera y desagüe con esponja como un sistema viable para el levante de las crías durante las primeras etapas de vida, en este sistema se destaca que las principales características que se deben tener en cuenta son las de romper la tensión superficial de agua para evitar la flotabilidad de los animales y la succión y pérdida del alimento por el filtro de salida, estas condiciones son vitales para la supervivencia durante la fase pelágica de esta especie (Tabla 6). Además de esto, es necesario resaltar que este sistema fue construido con materiales asequibles, económicos y posee una capacidad en volumen superior al sistema de 12 L, logrando mantener un mayor número de animales, disminuyendo los requerimientos de infraestructura y optimizando el suministro de alimento, siendo este sistema una buena alternativa para el cultivo de caballitos a mayor escala.

Molina *et al.* (2010), trabajaron con *H. hippocampus* implementando dos intensidades de aeración a las incubadoras (media y fuerte), con el fin de impedir el acceso de las crías a la superficie, reducir la captación de aire y la aparición de burbujas, observando que al utilizar aeración media la mortalidad fue del 100%, mientras que con la alta mejoró la supervivencia, situación que se detectó a partir del sistema 4, donde al reemplazar la entrada lateral de agua por aire, la circulación de los caballitos dentro del recipiente era mucho menos brusca que cuando se utilizó agua (sistema 3).

Los sistemas de cultivo son la clave para garantizar una buena supervivencia de las crías y juveniles de caballitos de mar. Los sistemas Kreisel (Koldewey, 2005), o pseduokreisel, son diseños eficaces porque reducen los espacios sin circulación en el tanque. El sistema 5 (Tabla 6), es similar a este tipo de acuarios, pero debido a la dificultad para manejar diferentes volúmenes no se pudo utilizar para el bioensayo de densidades.

Tanto la incubadora de 12 L circular como la de 16 L cilíndrica con entrada en regadera y desagüe con tamiz y espuma, pueden utilizarse para el levante de *H. reidi*, permitiéndole a las crías atravesar su etapa pelágica con éxito y mejorando la supervivencia en condiciones de laboratorio. Este es el primer estudio que se realiza con crías de *H. reidi* para evaluar densidades de siembra. En los estudios mencionados anteriormente se utilizaron caballitos en la fase de juveniles lo cual permite tener mayores supervivencias.

## 8.2 BIOENSAYO DE DENSIDAD

Aunque son muchos los estudios que se han llevado a cabo para el cultivo de caballitos de mar, la baja supervivencia de las crías y juveniles es el cuello de botella para el cultivo de esta especie (Adams *et al.*, 2001), en el cultivo de caballitos de mar es de esperarse una baja supervivencia de crías y juveniles donde valores arriba del 50% de mortalidad son frecuentes (Sisal, 2009).

Durante el estudio en laboratorio los resultados mostraron una supervivencia baja para las tres densidades de siembra evaluadas, observando que al aumentar las densidades en los ensayos con 1, 3 y 6 ind.L<sup>-1</sup>, los porcentajes de supervivencia tendían a disminuir progresivamente. A su vez es importante resaltar que durante el primer mes de vida se presenta una fase crítica en la mayoría de especies del género *Hippocampus*, para *H. reidi* se observaron mortalidades sucesivas después del cuarto día muestreo. Resultados semejantes a los encontrados durante el estudio, los tuvieron con mayor rigor Giraldo y Polania (2005), los autores evaluaron tres sistemas controlados para *H. reidi* a una densidad de 3 ind.L<sup>-1</sup>, obteniendo mortalidades hasta del 100%. Olivotto *et al.*, (2008), sin registrar la densidad durante el estudio realizado, trabajaron con juveniles de la misma especie obteniendo una supervivencia del 10%. Melo (2010), con densidades de 3 y 5,8 ind.L<sup>-1</sup> en *H. reidi* presentó una etapa crítica del tercer al sexto día, con una supervivencia del 20%. Zuluaga (2010), sin reportar la densidad

utilizada, evidenció una crisis constante en el cultivo a los cinco días de vida en esta especie, presentando al final del estudio una supervivencia del 31%. Hora y Joyeux (2009), con densidades de 4,1; 1,6 y 0,8 ind.L<sup>-1</sup> en la misma especie observaron picos altos de mortalidades del día 4 - 6 y al día 22 de cultivo con registros de supervivencia del 35% a los 20 días de estudio, siendo esta supervivencia la más alta en comparación con el resto de investigaciones. Posteriormente Hora y Joyeux (2009) se refirieron a que estas mortalidades se pueden producir por la imposibilidad de las crías de cazar en los primeros días de vida, al no poder ingerir alimento durante esta etapa crítica y al no contar con reservas vitelinas.

En otras especies de *Hippocampus*, Payne y Rippingale (2000), con densidades de 2 ind.L<sup>-1</sup> registraron también un episodio de mortalidad fuerte en *H. subelongatus* durante el 4-6 día. Lin *et al.*, (2008), sin mencionar la densidad en su estudio, encontraron que la mortalidad de las crías de *H. erectus* fue muy alta durante los 4-7 día de nacidas, sin embargo lograron obtener al final del estudio una supervivencia del 71%, Woods (2003b), obtuvo supervivencias menores a 80% en *H. abdominalis* y Hilomen-Garcia (1999), encontró supervivencias entre el 15 a 30%, en *H. kuda*. Durante este estudio se presentó una alta tasa de mortalidad que de igual forma fue registrada por algunos estudios con esta misma especie. Sin embargo se observa que para especies diferentes se obtuvieron resultados por encima a los registrados en el experimento.

Koldewey (2005) y Li (1999), resaltan que uno de los mayores problemas asociados con el cultivo de crías y juveniles de caballitos de mar es la determinación del tipo más deseable u óptimo de alimento. Lunn y Hall (1998) indican que los nauplios de artemias son los más utilizados, como alimento para los caballitos, pero no son ideales para la cría de juveniles de todas las especies. Durante el desarrollo del experimento, el estrés al que fueron sometidos durante el muestreo y el constante cambio de volumen en las incubadoras para ajustarlos a

las densidades determinadas en los tratamientos pudo afectar en gran parte la su supervivencia.

Para el crecimiento en términos de peso se registró un valor inicial promedio de las crías al momento de nacer de 1,75 mg, registrando posteriormente al octavo día el mayor incremento para el tratamiento de 6 ind.L<sup>-1</sup> con 4,64 mg; de la misma manera en este tratamiento se presentaron los porcentajes más bajos de supervivencia. Woods (2003a), evaluó densidades de 1, 2, y 5 ind.L<sup>-1</sup> en *H. abdominalis* observando que el crecimiento es inversamente proporcional a la densidad, Wong y Benzie (2003) trabajaron densidades con juveniles *H. whitei* encontrando que densidades bajas (0,5 y 1 ind.L<sup>-1</sup>) no fueron significativas en el crecimiento para esta especie. Lin *et al.*, (2010), en *H. erectus* obtuvieron el doble de incremento en peso húmedo en los juveniles cultivados a 1 ind L<sup>-1</sup>. Aún cuando es de esperarse que a menor densidad tanto la supervivencia como el incremento en peso sean mayores, los resultados pueden variar según la especie como se menciona anteriormente. Es necesario resaltar que este tipo de investigaciones con densidades no se ha evaluado en la etapa de crías para ninguna especie del género *Hippocampus*, hasta el momento no hay suficiente información acerca del cultivo de *H. reidi*, siendo este el primer trabajo en evaluar densidades de siembra en crías de caballitos de mar recién nacidas. En la actualidad los sistemas productivos buscan desarrollar paquetes tecnológicos que contemplen modelos intensivos de larvicultura, orientados a evaluar factores no interactivos como intensidad de luz, disponibilidad de alimento, y también factores interactivos como densidad de siembra y heterogeneidad de crecimiento (Kestemont *et al*, 2003; Nuñez *et al.*, 2008).

## 9 CONCLUSIONES

- El sistema de 16 L con regadera y filtro de esponja y el de 12 L circular con cinco entradas de agua son incubadoras que rompen la tensión superficial y permiten la circulación del agua, manteniendo a los organismos en la columna de agua y reteniendo el alimento por mayor tiempo. De esta forma cumplen con los criterios necesarios para el cultivo de caballitos, principalmente aquellos que presentan fase pelágica.
- Concentraciones de Benzocaina a 0,2 y 0,3 mg.L<sup>-1</sup> pueden ser utilizadas para muestrear crías de *H. reidi* de una semana de vida sin que se evidencie efectos en la supervivencia. El tiempo para que haga efecto el anestésico y la posterior reacción del organismo es proporcional a su tamaño.
- El tratamiento a una densidad de 1 ind.L<sup>-1</sup> presentó el mejor porcentaje de supervivencia, mientras que los mayores pesos se dieron en el tratamiento de 6 ind.L<sup>-1</sup>.
- Dadas las peculiaridades de una especie como *Hippocampus reidi*, por presentar una fase pelágica en las crías recién nacidas que dificulta su manejo, sumado a las altas tasas de mortalidades que se presentan durante la primera semana, que impiden el mantenimiento de todas las réplicas, dificulta evaluar estadísticamente el efecto de la densidad de siembra.



## 10 BIBLIOGRAFÍA

- Adams, M.B., Powell, M.D., Purser, G.J. 2001. Effect of acute and chronic ammonia and growth of juvenile big bellied seahorse. *Journal of Fish Biology* 58: 848-860.
- Álvarez-González, C.A., Ortiz-Galindo, J.L., Dumas, S., Martínez-Díaz, S.F., Hernández-Ceballos, D.E., Alamo, T.G.D., Moreno-Legorreta, M., Peña-Martínez, R. y Civera-Cerecedo, R. 2001. Effect of stocking density on the growth and survival of spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus* larvae in a closed recirculating system. *Journal of the World Aquaculture Society*, 32 (1): 130-137.
- Álvarez-Lajonchère, L., Hernández-Molejón, O.G. 2001. Producción de juveniles de peces estuarinos para un Centro en América Latina y el Caribe: diseño, operación y tecnologías. *World Aquaculture Society*, Baton Rouge. 424 p.
- Baras, E. 1999. Functional implications of early sexual growth dimorphism in vundu. *J. Fish Biol.*, 54: 119–124.
- Benetti, D.D., Sardenberg, B., Welch, A., Hoenig, R., Orhun, M.R. y Zink, I. 2008. Intensive larval husbandry and fingerling production of cobia *Rachycentron canadum*. *Aquaculture*, 281 (1-4): 22-27.
- Björnsson, B. 1994. Effects of stocking density on growth rate of halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) reared in large circular tanks for three years. *Aquaculture*, 123 (3-4): 259–270.
- Carpio, V., Cabello J. 2009 Caballitos de Mar en el acuario. Monografía <http://www.acuariosmarinos.com/forums/showthread.php?14027-Caballitos-de-mar-en-el-acuario-marino-por-Victor-Carpio-yJosepCabello>.
- Chamorro, A., Planas, M. 2008. Diseño de acuarios para mantenimiento y reproducción en cautividad del caballito de mar *Hippocampus guttulatus* Cuvier 1829, XI Congreso Nacional de Acuicultura. <http://www.iim.csic.es/proyectohippocampus/DOCUMENTACION/publis/1.pdf>.
- CITES (Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Flora and Fauna). 2008. Appendices II. *Hippocampus reidi* Ginsburg 1933 <http://www.cites.org>.

- Conides, A.J., Glamuzina, B. 2001. Study on the early larval development and growth of the red porgy, *Pagrus pagrus* with emphasis on the mass mortalities observed during this phase. *Scientia Marina*, 65 (3): 193-200.
- Dayton, L. 1995. The killing reefs. *New Scientist*, 148 (2003): 14-15.
- Fenner, R.B. 1998. Pipes, horses and dragons: a real challenge. *Tropical Fish Hobbyist*. May: 16-29.
- Foster, S.J., Vincent, A.C.J. 2004. Life history and ecology of seahorses: implications for conservation and management. *J. Fish Biol.*, 65 (1): 1-61.
- Giménez, G., Estévez, A. 2008. Effect of larval and prey density, prey dose and light conditions on first feeding common dentex (*Dentex dentex* L.) larvae. *Aquaculture Research*, 39 (1): 77-84.
- Giraldo., J., Polanía, P. 2005. Cría de caballito de mar *Hippocampus reidi* bajo tres sistemas controlados en el Acuario Mundo Marino (Santa Marta, Colombia). *Revista Científica U.D.C.A actualidad y divulgación científica*, 8 (2): 77-84.
- Giwojna, P., Giwojna, B. 1999. Seahorse breeding secrets: Part I. Ten common mistakes and how to avoid them. *Freshwater Mar. Aquar.*, 1: 8-31.
- González, H.E., Guevara, M.C., Alcalá, A., Selema, R. 2004. Algunos aspectos biológicos sobre el Caballito de Mar Narizón (*Hippocampus reidi* Ginsburg, 1933) en cautiverio. *Acuario Nacional (Cuba). Comunicación Científica CIVA*. [http:// www.civa2004.org](http://www.civa2004.org).
- Goudie, C.A., Simco, B.A., Davis, K.B., Carmichael, G.J. 1994. Growth of channel catfish in mixed sex and monosex pond culture. *Aquaculture*, 128 (1-2): 97-104.
- Hargrove, M. 1998. Knights of the sea. *Trop. Fish Hobbyist*, 46 (9): 30-40.
- Hilomen-Garcia, G. 1999. AQD's marine ornamental fish project, SEAFDEL. *Asian Aquaculture* 21: 31-38.
- Hitzfelderg, G.M., Holt, J., Fox, J., McKee, D. 2006. The effect of rearing density on growth and survival of cobia, *Rachycentron canadum*, larvae in a closed recirculating aquaculture system. *Journal of the World Aquaculture Society*, 37 (2): 204-209.
- Hoegh, G.O., Smith, G.J. 1989. The effect of sudden changes in temperature, light, and salinity on the population density and export of zooxanthellae from the reef corals *Styophora postillata* Esper and *Seriatophora hystrix* Dana. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 129: 279-304.

- Holm, J.C., Refstie, T., Bo, S. 1990. The effect of fish density and feeding regimes on individual growth rate and mortality rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 89 (3-4): 225-232.
- Hora M.S.C., Joyeux J.C. 2009. Closing the reproductive cycle: Growth of the seahorse *Hippocampus reidi* (Teleostei, Syngnathidae) from birth to adulthood under experimental conditions. *Aquaculture*, 292 (1-2): 37–41.
- Houde, E.D. 1975. Effects of stocking density and food density on survival, growth and yield of laboratory-reared larvae of sea bream *Archosargus rhomboidalis* (L.) (Sparidae). *Journal of Fish Biology*, 7: 115-129.
- IUCN (International Union for the Conservation of Nature). 2008. IUCN red list of threatened species. <http://www.iucnredlist.org>.
- Jobling, M. 1994. Fish bioenergetics. Chapman & Hall. Londres, United Kingdom. 309 p.
- Kestemont, P., Jourdan, S., Houbart, C., Paspatis, M., Fontaine, P., Cuvier, A., Kentouri, M., Baras, E. 2003. Size heterogeneity, cannibalism and competition in cultured predatory fish larvae: biotic and abiotic influences. *Aquaculture*, 227: 333-356.
- King, N.J., Howell, W.H., Huber M., Bengtson, D.A. 2000. Effects of larval stocking density on laboratory-scale and commercial-scale production of summer flounder *Paralichthys dentatus*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 31 (3): 436-445.
- Koldewey, H. 2005. Syngnathid husbandry in public aquariums. 2005 manual. Zoological society of London and Project seahorse. London, UK. 137 p.
- Lazard, J., Cacot, P., Slembrouck, J., Legendre, M. 2009. La pisciculture des Pangasiidae. *Cah. Agric.*, 18 (2-3): 164-173.
- Lecompte, O. 2010. Acuario para la exhibición de medusas en Mundo Marino de Santa Marta. <http://www.boletin.utadeo.edu.co/index>.
- Li, J.X. 1999. The technology of seahorse aquaculture. *Forage scan*, 11(11): 36-37.
- Lin, J., Zhang, D. 2001. Reproduction in a simultaneous hermaphroditic shrimp, *Lysmata wurdemanni*: *Marine Biol.*, 139 (5): 919-922.
- Lin, Q., Lin J., Huang, L. 2010. Effects of light intensity, stocking density and temperature on the air-bubble disease, survivorship and growth of early juvenile seahorse *Hippocampus erectus* Perry, 1810. <http://www/AquacultureResearch.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2109.2010.02573>. Article first published online: 9/06/10: 1-8.

- Lin, Q., Lin, J., Zhang, D., 2008. Breeding and juvenile culture of the lined seahorse, *Hippocampus erectus* Perry, 1810. 277: 287–292.
- Lin, Q., Zhang, D., Lin, J. 2009. Effects of light intensity, stocking density, feeding frequency and salinity on the growth of sub-adult seahorses *Hippocampus erectus* Perry, 1810. *Aquaculture*, 292 (1-2): 111–116.
- Lopes, J.M., Silva, L, Baldisserotto, B. 2001. Survival and growth of silver catfish larvae exposed to different water pH. *Aquacult Int.* 9: 73-80.
- Lunn, K.E., Hall, H.J., 1998. Breeding and management of seahorses in aquaria. Briefing Documents for the first international aquarium workshop on seahorse husbandry, management and conservation. Project seahorse, Chicago, U.S.A. 98 p.
- Martinez-Cárdenas, L., Purser, G.J. 2007. Effect of tank colour on artemia ingestion, growth and survival in cultured early juvenile pot-bellied seahorses (*Hippocampus abdominalis*). *Aquaculture*, 264 (1-4): 92–100.
- McEvoy, L.A., Navarro, J.C., Bell, J.G., Sargent, J.R., 1995. Autoxidation of oil emulsions during the Artemia enrichment process. *Aquaculture* 134: 101–112.
- Melo, A. 2010. Efecto de la temperatura y la salinidad en la supervivencia y crecimiento de crías de *Hippocampus reidi*, en cautiverio. Documento técnico INVEMAR, 32 p.
- Molina, L., Socorro, J., Herrera, R., Otero, F., Villares, P., Izquierdo, M. 2007. Experiencias preliminares para el cultivo de crías de *Hippocampus hippocampus*. <http://www.iim.csic.es/proyectohippocampus/DOCUMENTACION/publis/8.pdf.13/03/2011>.
- Montero, D., Izquierdo, M., Tort, L., Robaina, L., Vergara, J. 1999. High stocking density produces crowding stress altering some physiological and biochemical parameters in gilthead seabream, *Sparus aurata*, juveniles. *Fish Physiology and Biochemistry*, 20 (1): 53-60.
- Murugan, S., Dhanya, R., Sreepada, S., Rajagopal, T., Balasubramanian T. 2009. Breeding and mass-scale rearing of three spotted seahorse, *Hippocampus trimaculatus* Leach under captive conditions. *Aquaculture*: 290 (1): 87-96.
- Núñez, J., Dugué, R., Corcuy-Arana, N., Duponchelle, F., Renno, J., Raynaud, T., Hubert, N., Legendre, M., 2008. Induced breeding and larval rearing of Surubí, *Pseudoplatystoma fasciatum* (Linnaeus, 1766), from the Bolivian Amazon. *Aquacult Res*; 39: 764-776.

- Oeser Michael, 2005. Medicina tradicional china. <http://www.eltartalo.com/blogchina/medicina-tradicional-china>
- Olivotto, M.A., Avella, S.G., Piccinetti, C., Navarro, R.P., Carnevali, O. 2008. Breeding and rearing the longsnout seahorse *Hippocampus reidi*: Rearing and feeding studies. *Aquaculture*, 283 (1-4): 92–96.
- Ortega-Salas, A.A., Reyes-Bustamante, H. 2006. Fecundity, survival and growth of the seahorse *Hippocampus ingens* (Pisces: Syngnathidae) under semi- controlled conditions. *Revista de Biología Tropical, Universidad de Costa Rica*, 54 (4): 1099-1102.
- Ospina-Salazar, G.H., Santos-Acevedo, M., López-Navarro, J., Gómez-López, D.I., Álvarez-Barrera, J.E. y J. Gómez León. 2011. Avances en la reproducción y mantenimiento de peces marinos ornamentales. Serie Documentos Generales INVEMAR No. 46. Santa Marta, 100 p.
- Payne, M.F., Ripplingale, R.J. 2000. Rearing west Australian seahorse, *Hippocampus subelongatus* juveniles on copepod nauplii and enriched Artemia. *Aquaculture*, 188 (3-4): 353–361.
- Planas, M., Chamorro, A., Quintas, P., Quintas, Q. 2008. Establishment and maintenance of threatened long-snouted seahorse, *Hippocampus guttulatus*, broodstock in captivity. *Aquaculture*, 283: 19–28.
- Reyes-Bustamante, H., Ortega-Salas, A.A. 1999. Cultivo del caballito de mar, *Hippocampus ingens* (Pisces: Syngnathidae) en condiciones artificiales. *Rev. biol.trop*, 47 (4): 1045-1049.
- Scarratt, A.M. 1995. Techniques for raising lined seahorses (*Hippocampus erectus*). *Aquar. Front.* 3: 24–29.
- Segura, L., Hayashi, C., De Souza, S., Soares, C. 2004. Canibalismo entre larvas de pintado, *Pseudoplatystoma corruscans*, cultivadas sobre diferentes densidades de estocagem. *Acta Scientiarum Biological Sciences*; 26 (3): 299-302.
- Sheng, J. Lin, Q., Chen Q., Shen, L., Lu, J. 2007. Effect of starvation on the initiation of feeding, growth and survival rate of juvenile seahorses, *Hippocampus trimaculatus* Leach and *Hippocampus kuda* Bleeker. *Aquaculture*, 271 (14): 469–478.
- Siddiqui, A.Q., Al-Harbi, A.H., 1997. Effects of sex ratio, stocking density and age of hybrid Tilapia on seed production in concrete tanks in Saudi Arabia. *Aquac. Int.*, 5 (3): 207–216.
- Silva, S., Anderson, T., 1995. Fish nutrition in aquaculture. Chapman & Hall Aquaculture Series. Londres, United Kingdom. 31 p.

- Sisal, A. 2009. Manual Básico de Producción de Juveniles Caballitos de Mar *Hippocampus erectus*. [www.piecemo.org/cgi-bin/a2dl.12/04/2011](http://www.piecemo.org/cgi-bin/a2dl.12/04/2011).
- Tucker, J.W. 1998. Marine fish culture. Kluwer Academic Publishers, Boston. USA. 750 p.
- Underwood, D. 2010. A scalable method of raising *Hippocampus erectus*. <http://www.seahorse.org/library/articles/library/library.shtml>.
- UNEP-WCMC. 2003. Checklist of fish and invertebrates listed in the CITES appendices and in EC Regulation No. 338/97. (United Nations Environmental Programme (UNEP) & World Conservation Monitoring Center (WCMC): Joint Nature Conservation Committee. <http://www.unep-wcmc.org/species/OFT-PDF/Consultation-Paper.pdf>. 08/06/10.
- Vincent, A.C.J. 1995. Trade in seahorses for traditional Chinese medicines, Aquarium Fishes and Curios. TRAFFIC Bulletin, 15 (3): 125-128.
- Wabnitz, C., Taylor, M., Green, E., Razak, T. 2003. From Ocean to Aquarium. UNEP-WCMC, Cambridge, UK. [http://www.unepwcmc.org/resources/publications/UNEP\\_WCMC\\_bio\\_series/17.htm](http://www.unepwcmc.org/resources/publications/UNEP_WCMC_bio_series/17.htm). 2/02/10.
- Wilson, M.J., Vincent, A.C.J. 1998. Preliminary success in closing the life cycle of exploited seahorses species, *Hippocampus* spp., in captivity. Aquarium Sci. Conservation, 2 (4): 179–196.
- Wong, J.M., Benzie, J.A.H. 2003. The effects of temperature, *Artemia* enrichment, stocking density and light on the growth of juvenile seahorses, *Hippocampus whitei* (Bleeker, 1855), from Australia. Aquaculture, 228 (1-4): 107-121.
- Woods, C.M.C. 2000. Improving initial survival in cultured seahorse, *Hippocampus abdominalis* leason, 1827 (Teleostei: Syngathidae). Aquaculture, (190): 377-388.
- Woods, C.M.C. 2002. Natural diet of the seahorse *Hippocampus abdominalis*. New Zeal. J. Mar. Freshwat. Res., 36 (3): 655-660.
- Woods, C.M.C. 2003a. Effect of stocking density and gender segregation in the seahorse *Hippocampus abdominalis*. Aquaculture, 218 (1-4): 167-176.
- Woods, C.M.C. 2003b. Growth and survival of juvenile seahorse *Hippocampus abdominalis* reared on live, frozen and artificial foods. Aquaculture, 220 (1-4): 287–298.

Zuluaga, J. 2010. Evaluación de la viabilidad de juveniles de *Hippocampus reidi* Ginsburg, 1933 bajo condiciones controladas (Acuario Mundo Marino, Santa Marta, Colombia). Tesis para optar al título de Biólogo Marino de la Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano, Facultad de Ciencias Naturales e Ingeniería, Programa de Biología Marina. Santa Marta. 79 p.